

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

**Aplicación terapéutica de IFN β e
inhibidores de PDE4 y 7 en EAE:
Modulación del equilibrio
Th17/TregFoxp3**

TESIS DOCTORAL

Coral González García

Madrid, 2010



Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



Aplicación terapéutica de IFN β e inhibidores de PDE4 y 7 en EAE: Modulación del equilibrio Th17/TregFoxp3

Coral González García
Licenciada en Biología (UAM)

Directora de tesis
Dra. Sara Ballester Jareño
Investigador Titular de OPI
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III

Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Majadahonda, Madrid

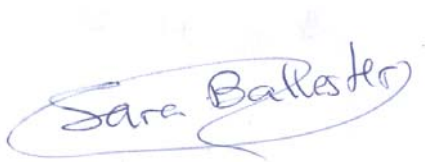
Sara Ballester Jareño, Investigadora Titular de OPI del Instituto de Salud Carlos III dentro del Área de Biología Celular y del Desarrollo del Centro Nacional de Microbiología.

CERTIFICA: que D^a. Coral González García, licenciada en C.C. Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

“Aplicación terapéutica de IFN β e inhibidores de PDE4 y 7 en EAE: Modulación del equilibrio Th17/TregFoxp3.”

En mi opinión, este trabajo de investigación reúne todas las condiciones requeridas por la normativa vigente en la Universidad Autónoma de Madrid, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado.



Fdo: Dra. Sara Ballester Jareño
Directora de Tesis Doctoral
Investigadora Titular de OPI
Instituto de Salud Carlos III
Centro Nacional de Microbiología
Área de Biología Celular y del
Desarrollo



Vº Bº: Dr. Victor Calvo López
Tutor de Tesis Doctoral
Profesor Titular
Dpto. Bioquímica
Facultad de Medicina UAM



En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Sara Ballester la oportunidad que me dio al seleccionarme para realizar esta Tesis con ella. Muchas gracias por la confianza depositada, por contagiarme tu ilusión por la ciencia y hacerme ver las cosas de otra manera, aunque no seamos matemáticas, ni químicas... Sara, muchas gracias por todo lo que me has enseñado, aunque solo se me haya quedado una mínima parte de lo que tú sabes. Y gracias sobre todo por el apoyo que me has dado, incluso en los malos momentos, ya no diré que me siento incapaz de hacer algo para lo que me he formado, gracias.

También me gustaría agradecer al Dr. Víctor Calvo la tutoría de esta Tesis.

Gracias a todo el grupo de Regulación Génica su ayuda, apoyo y amistad. A los que en un principio me enseñaron a manejar por el laboratorio, Rocío y las Dras. Beatriz Dorado y María José Jerez, gracias por toda la ayuda y dedicación. Bea, muchísimas gracias por tener tanta paciencia cuando se me torcían las cosas incluso cuando tú estabas saturada de trabajo. Muy especialmente tengo que agradecer al Dr. Francisco Manuel Martín-Saavedra sus buenos consejos, su amistad y su inigualable ayuda en todo lo que he necesitado. Pachi gracias por echarme siempre una mano incluso cuando ya no estabas en este laboratorio, no sé que hubiese hecho sin ti. A la Dra. Alicia Ballester, gracias por tus consejos y tu ayuda en esos super-experimentos donde siempre una ayudita viene bien. A mis chic@s, sin vosotros no podría estar escribiendo estas palabras, esta tesis es tan mía como vuestra, gracias por vuestra amistad, vuestro apoyo en buenos y malos momentos, por aguantarme cuando era inaguantable y sobre todo por ese trabajo sin el que no podría haber terminado esto. Gracias Raquel, Bea y Javi, os voy a echar mucho de menos.

Agradezco al grupo vecino, IC (Pilar, Gloria, Almudena, María y Eduardo) su apoyo en todo, gracias por estar siempre ahí dispuestos a echar una mano. Gracias por hacer de los cumpleaños unas reuniones inolvidables, no cambiéis. No me puedo olvidar de Eliana, que aunque no está ya en el grupo, ha sido una gran compañera.

Agradezco a César Eguiluz su colaboración en los experimentos de ratones, por ayudarnos con nuevas técnicas y por el trabajo invertido en los estudios histológicos. A Raquel Pérez porque sin tu colaboración no habríamos visto esos infiltrados tan bonitos, además de darte las gracias por tus visitas que hacen que la mañana sea más entretenida.

Quiero mostrar mi gratitud a todos aquellos que me han echado alguna vez una mano en el citómetro, Belén, Mario, Borja.... Al personal de cocina, almacén, animalario, mantenimiento y administración, muchísimas gracias, porque sin vuestra ayuda esto sería más complicado.

Agradezco a mis amigos, que aún no teniendo mucho que ver con el mundo de la ciencia, siempre han estado ahí, interesados y preocupados por mi trabajo. Gracias a tod@s por animarme y apoyarme en todo momento. No puedo nombrar a todos porque sois demasiados y me olvidaría de alguno.

Agradezco a mi familia, tíos, primos y abuelos, y a mi familia política todo el ánimo y cariño que me habéis dado todo este tiempo, sobre todo estos últimos meses.

Agradezco a mis padres, Celia y Jose, su apoyo incondicional, un apoyo que he tenido siempre. Gracias por apoyarme en mi ilusión de estudiar Biología y por educarme como lo habéis hecho, porque gracias a vosotros soy como soy, os quiero, no podría haber tenido mejores padres. A mi hermana Katxé, porque sé que siempre vas a estar ahí, gracias por escucharme, aguantarme y quererme tanto, aunque no te gusten los besos. ¡Te quiero mucho sister!

Y finalmente a la persona que más me ha sufrido en los últimos meses, que más me ha aguantado y que más me ha querido. Gracias Javi por ser como eres y porque es verdad que tienes el cielo ganado. Esta etapa está conseguida. Ahora solo queda continuar.

En este trabajo hemos analizado algunos efectos por los cuales Interferón β (IFN β) e inhibidores de fosfodiesterasas (PDE) podrían desempeñar su efecto terapéutico en Esclerosis Múltiple (EM). IFN β es una de las terapias más empleadas en EM siendo efectiva también en el modelo animal de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). Sin embargo, los mecanismos concretos por los que ejerce su efecto beneficioso no son del todo conocidos. Por otra parte, desde hace tiempo la inhibición de PDE4 ha mostrado propiedades anti-inflamatorias, aunque sus efectos secundarios han llevado a la búsqueda de nuevas PDE candidatas, entre las que destaca PDE7 que se expresa en linfocitos T y en sistema nervioso central (SNC).

Hemos ensayado IFN β e inhibidores de PDE4 y/o PDE7 sobre células T *in vitro*, tanto en linfocitos T de fenotipo ya establecido, como durante el proceso de definición de fenotipo de células T primarias hacia Th1, Th2 y Th17. Por otra parte, además de los efectos analizados *in vitro*, se ha llevado a cabo el estudio de los efectos de estos fármacos *in vivo*, en el modelo de EAE inducida por MBP (EAE-MBP) en ratones SJL. Tanto IFN β como la inhibición de PDE4 mostraron una disminución en los síntomas clínicos de EAE. Los resultados indican que los efectos de ambos fármacos correlacionan con un aumento de células Foxp3⁺ y una disminución de los niveles de IL-17 tanto en órganos periféricos como en SNC. IFN β también es capaz de aumentar los niveles de células Foxp3⁺ *in vitro* mediante protección de apoptosis a estas células. Además, la disminución de los niveles de IL-17 mediada por IFN β es dependiente de la presencia de células nTreg. En el caso de la inhibición de PDE4 por Rolipram los resultados *in vitro* mostraron un aumento inesperado de la producción de IL-17 por células CD4⁺; este aumento también se encontró en las primeras etapas del tratamiento *in vivo* de EAE. No obstante, en las fases aguda y crónica de la enfermedad los niveles de IL-17 descendieron bajo tratamiento con Rolipram por debajo de los encontrados para los animales no tratados. Además, la inhibición de PDE4 *in vivo* medió un aumento de IL-10, citoquina fuertemente implicada en el control de la respuesta inmune, que junto con la actividad de células nTreg, podría estar neutralizando la función patogénica de IL-17. Por otra parte, hemos comprobado por primera vez que la inhibición simultánea de PDE4 y PDE7 permite disminuir las dosis de inhibidores de PDE4 con iguales o mejores efectos terapéuticos en EAE. Esto pone de manifiesto la ventaja que puede suponer en clínica el desarrollo de inhibidores duales de ambas PDE.

This work analyzes some effects through which Interferon β (IFN β) and phosphodiesterase (PDE) inhibitors might carry out a therapeutic effect in Multiple Sclerosis (MS). IFN β is one of the most widely used therapies in MS and it is effective also in the animal model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). However, the accurate mechanisms to explain its therapeutic activity in the disease are not fully revealed. On the other hand, an anti-inflammatory effect has been shown due to the inhibition of PDE4, although its side effects have led to the search for new PDE as target candidates, among which PDE7 stands out.

We have assayed IFN β and PDE4 and / or PDE7 inhibitors, *in vitro*, on T cells, either in differentiated T cells, as during the process of differentiation of naïve T cells toward Th1, Th2 and Th17. On the other hand, a study on the effects of these drugs *in vivo*, in EAE induced by MBP (EAE-MBP) in SJL mice has been carried out. IFN β and PDE4 inhibition showed a decrease in clinical symptoms of EAE. Results indicate that the therapeutic effects of both drugs in EAE correlate with an increase of Foxp3⁺ cells and a decrease of the levels of IL-17 in peripheral organs and in CNS. IFN β is also able to increase the levels of Foxp3⁺ cells *in vitro* by means of the protection of apoptosis in these cells. In addition, the decrease of IL-17 levels through the IFN β treatment was dependent on the presence of nTreg cells. In case of the *in vitro* inhibition of PDE4 by Rolipram, results showed an unexpected increase of IL-17 produced by CD4⁺ cells. This increase was also observed at the first stages of the *in vivo* treatment of EAE. Nevertheless, IL-17 levels were decreased by Rolipram treatment below to that found for the untreated animals at the acute and chronic phases of the disease. Furthermore, *in vivo* PDE4 inhibition led to an IL-10 increase, cytokine strongly involved in the control of the immune response. This IL-10 increase together with the activity of nTreg cells might neutralize the pathogenic function of IL-17. However, we have found for the first time that simultaneous inhibition of PDE7 and PDE4 allows a reduction of the doses of PDE4 inhibitor with similar or better therapeutic effects in EAE. These results evidence that the development of dual inhibitors for both PDE can be clinically advantageous.

ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	17
--------------------------------	----

INTRODUCCIÓN	23
--------------------	----

1.- INMUNOPATOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL	25
2.- CITOQUINAS IMPLICADAS EN EM Y EAE.	26
2.1.- Citoquinas proinflamatorias.	26
2.2.- Citoquinas anti-inflamatorias	28
3.- PRINCIPALES TIPOS CELULARES IMPLICADOS EN EM Y EAE	30
4.- LINFOCITOS T CD4 ⁺ Y SU PAPEL EN EM Y EAE	31
4.1.- Linfocitos T cooperadores.	34
4.2.- Células T reguladoras.	36
4.3.- Regulación del balance Th17/Treg.....	38
5.- TRATAMIENTOS EN EAE/EM.	39
5.1.- Interferón β como tratamiento para EAE Y EM	41
5.2.- Inhibidores de PDE como tratamiento para EAE Y EM	42

OBJETIVOS	45
-----------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	49
----------------------------	----

1.- LÍNEAS CELULARES	51
2.- ANTICUERPOS	53
3.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	54
4.- OLIGONUCLEÓTIDOS.	55
5.- PLÁSMIDOS.....	55
6.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL	56

7.- PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T	56
8.- DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LINFOCITOS T	57
9.- PROLIFERACIÓN CELULAR	58
10.- CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUQUINAS MEDIANTE ELISA	59
11.- CUANTIFICACIÓN DE AMPc INTRACELULAR	59
12.- ANÁLISIS DE APOPTOSIS, CICLO Y TOXICIDAD CELULAR	59
13.- EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE E INTRACELULARES	60
14.- OBTENCIÓN DE RNA TOTAL	60
15.- CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE RNA MENSAJERO	60
16.- INDUCCIÓN ACTIVA DE EAE Y TRATAMIENTOS.	62
17.- OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LNC, BAZOS Y SNC	63
18.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
RESULTADOS	65
1.- EFECTO DE IFN β SOBRE LINFOCITOS T	67
1.1.- Tratamiento <i>in vitro</i> de células T con IFN β	67
1.1.1.- Capacidad proliferativa de linfocitos T tratados con IFN β	67
1.1.2.- Actividad supresora de cultivos celulares CD4 ⁺	71
1.1.3.- Supervivencia de células nTreg en presencia de IFN β	73
1.1.4.- Expresión de citoquinas proinflamatorias en cultivos de células CD4 ⁺	75
1.2.- Tratamiento con IFN β <i>in vivo</i>	77
1.2.1.- Porcentaje de células CD4 ⁺ CD25 ⁺	77
1.2.2.- Niveles de expresión de IL-17	78
2.- EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE PDE4 Y PDE7 SOBRE LINFOCITOS T	79
2.1.- Tratamiento <i>in vitro</i> de células T de fenotipo Th definido con inhibidores de PDE4 y PDE7	80
2.1.1.- Medidas de toxicidad de inhibidores de PDE4 y PDE7	80

2.1.2.- Niveles de AMPc intracelular en el clon D10.G4.1 producidos por la inhibición de PDE4 y PDE7	81
2.1.3.- Influencia de los inhibidores de PDE sobre la actividad efectora del clon de linfocitos D10.G4.1	83
2.1.4.- Niveles de AMPc intracelular producidos por la inhibición simultánea de PDE4 y PDE7	84
2.1.5.- Actividad de factores de transcripción implicados en la función de células T	85
2.1.6.- Efecto sobre la actividad de los diferentes subtipos de células T cooperadoras	88
2.2.- EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE PDE4 Y PDE7 <i>IN VITRO</i> DURANTE EL PROCESO DE DEFINICIÓN DE FENOTIPO	91
2.2.1.- Respuesta proliferativa en células T	92
2.2.2.- Producción de citoquinas en células T	94
2.2.3.- Respuesta proliferativa y producción de IL-17 en células de bazo total	99
2.3.- TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i> CON INHIBIDORES DE PDE4 Y PDE7	100
2.3.1.- Grado sintomático de EAE	101
2.3.2.- Proliferación y producción de IL-17	102
2.3.3.- Procesos relacionados con el control de la actividad de IL-17	107
2.3.3.1.- IL-10	107
2.3.3.2.- Foxp3	108
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	127
ARTÍCULOS	151

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

- **Ac:** anticuerpo
- **Ag:** antígeno
- **AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- **AMV-RT:** transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar
- **APC:** alofococianina
- **AR:** Artritis Reumatoide
- **BHE:** barrera hematoencefálica
- **CBP:** *CREB binding protein*
- **cDNA:** DNA complementario
- **CFA:** adyuvante completo de Freund
- **CFSE:** *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
- **CP:** *crossing point*
- **CRE:** *cyclic AMP response element*
- **CREB:** *cyclic AMP response element binding protein*
- **CTLA-4:** *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*
- **CTL-2:** linfocitos citotóxicos dependientes de IL-2
- **D:** día
- **DC:** células dendríticas
- **DMSO:** dimetil sulfóxido
- **DNA:** ácido desoxirribonucleico
- **DO:** densidad óptica
- **E:** eficiencia
- **EAE:** encefalomiелitis autoinmune experimental
- **ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- **EM:** esclerosis múltiple
- **EMPP:** esclerosis múltiple primaria progresiva
- **EMPR:** esclerosis múltiple primaria recidivante
- **EMRR:** esclerosis múltiple recurrente remitente
- **EMSP:** esclerosis múltiple secundaria progresiva
- **FCM:** medio condicionado de fibroblastos
- **FCSi:** suero bovino fetal inactivado
- **Fig:** Figura
- **FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína
- **fmol:** femtomol
- **Foxp3:** *forkhead box p3*
- **GA:** Acetato de Glatirámico
- **GATA-3:** *GATA binding protein 3*
- **GITR:** *glucocorticoid induced TNF-receptor-related protein*
- **GM-CSF:** *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- **GMPc:** guanosín monofosfato cíclico
- **HLA:** *Human leukocyte antigen*
- **HMG-CoA:** 3-Hidroxi 3-Metil glutaril-coenzima A
- **HSV:** virus del *Herpes simplex*
- **i.p.:** infiltrado perivascular
- **IP:** Ioduro de Propidio
- **IC₅₀:** concentración inhibitoria del 50%
- **ICAM-1:** *intercellular adhesion molecule 1*
- **IFN:** interferón

- **Ig:** inmunoglobulina
- **IKK:** I κ B quinasa
- **I κ B:** inhibidor de proteínas κ B
- **IL:** interleuquina
- **IL-12R β :** cadena β del receptor de IL-12
- **IL-2R α :** cadena α del receptor de IL-2
- **IRF-4:** *Interferon regulatory factor 4*
- **iTreg:** células T reguladoras inducidas o adaptativas, Foxp3⁺
- **Jak:** Janus quinasa
- **KO:** *knock out*
- **LB:** linfocito B
- **LFA-1:** *Lymphocyte function-associated antigen 1*
- **LNC:** células de nódulo linfático
- **Luc:** gen luciferasa
- **MAG:** glicoproteína asociada a mielina
- **MBP:** proteína básica de mielina
- **MHC:** complejo principal de histocompatibilidad
- **MMP:** metaloproteasa de matriz
- **MOG:** glicoproteína asociada a oligodendrocito y mielina
- **mRNA:** RNA mensajero
- **MTT:** bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5-difeniltetrazolio
- **MTX:** Mitoxantrona
- **n:** nucleótido
- **NFAT:** factor nuclear de células T activadas
- **NF- κ B:** factor nuclear kappa de células B
- **NGF:** factor de crecimiento neuronal
- **NK:** *Natural Killer*
- **NO:** óxido nítrico
- **nTreg:** células T reguladoras naturales, Foxp3⁺
- **PBMC:** células mononucleares de sangre periférica
- **PBS:** tampón de fosfato salino
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **PDE:** Fosfodiesterasa
- **PE:** Ficoeritrina
- **PE-Cy7:** Ficoeritrina-Cianina 7
- **pg:** picogramos
- **pi:** post-inoculación
- **PKA:** proteína quinasa A
- **PLP:** proteína proteolipídica
- **PMA:** forbol 12-miristato 13 acetato
- **RLUs:** unidades relativas de luz
- **RNA:** ácido ribonucleico
- **ROR:** *retinoic-acid-related orphan nuclear receptors*
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **RT:** reacción de retrotranscripción.
- **Runx-1:** *Runt-related transcription factor 1 gene*
- **SEM:** error estándar de la media
- **Sc:** células de bazo

- **SNC:** sistema nervioso central
- **SNP:** sistema nervioso periférico
- **Stat:** *signal transducers and activators of transcription*
- **T-bet:** *T-box expressed in T cells*
- **Tc :** linfocito T citotóxico
- **TCR:** receptor de antígeno de la célula T
- **TGF:** factor de crecimiento transformante
- **Th:** linfocito T cooperador (*T helper*)
- **TK:** Tirosina quinasa
- **TMEV:** virus murino de la encefalomiелitis de Theiler
- **TNF:** factor de necrosis tumoral
- **TNFR:** receptor del factor de necrosis tumoral
- **Tr:** célula T reguladora
- **u:** unidad
- **VCAM-1:** *vascular cell adhesion molecule 1*
- **VLA-4:** *very late antigen 4*
- **WT:** *wildtype*

INTRODUCCIÓN

1.- INMUNOPATOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL.

La Esclerosis Múltiple (EM) se inicia entre los 20-30 años, manifestándose inicialmente con alteraciones sensitivas, motoras, visuales y del equilibrio. Existen distintos patrones. El más frecuente es el **Recurrente-Remitente (EMRR)**, que cursa en forma de brotes o recaídas con evolución hacia una recuperación total o parcial. La EMRR suele derivar en **Secundaria Progresiva (EMSP)**, en la que ya no existen brotes sino un empeoramiento constante sin periodos de remisión; se considera una forma avanzada de EM. La forma **Primaria Progresiva (EMPP)**, se caracteriza por la ausencia de brotes definidos desde el inicio de la enfermedad, con comienzo lento y sin periodos de remisión. La forma **Progresiva Recidivante (EMPR)** es una forma atípica, en la que hay progresión de la enfermedad desde el comienzo, pero con brotes agudos claros, con o sin recuperación completa. En los períodos entre brotes hay una progresión continua.

La EM fue caracterizada en 1868 por Charcot, quien describió acumulaciones perivasculares de células inflamatorias en sistema nervioso central (SNC) de pacientes con episodios intermitentes de disfunción neurológica (Charcot, 1868; Charcot, 1877). Thomas Rivers proporcionó la primera evidencia de que las células inmunes pueden atacar al cerebro, estableciendo lo que ahora es bien conocido como encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), modelo animal de EM, y sugirió que la EM surge como respuesta autoinmune a autoantígenos en un individuo genéticamente susceptible (Rivers *et al.*, 1933). La EAE y la EM tienen en común características como la destrucción de la vaina de mielina que recubre las fibras nerviosas, lesiones múltiples de localización perivascular más pronunciadas en cerebro y médula espinal y presencia de Ig en sistema nervioso central y en líquido cefalorraquídeo (Sospedra and Martin, 2005; Baxter, 2007; Barnett *et al.*, 2009). Aunque parte de la patogenia de la EM es todavía desconocida, se han asentado diversos conocimientos en los últimos años: es causada en parte por linfocitos T, está influenciada por factores medioambientales desconocidos, y existe una base genética relacionada con la predisposición a padecerla ya que se da una mayor prevalencia de la enfermedad entre familiares de pacientes (Sospedra and Martin, 2005).

Hasta el momento se han desarrollado diversos **modelos animales** para EM, que pueden diferenciarse en el modo de inducción [administración de antígenos de SNC (EAE activa), de células T reactivas a antígenos (EAE pasiva), o de virus neurotrópicos como el que utiliza el virus murino de la encefalomielitis de Theiler, TMEV], en el antígeno empleado (tejido completo, MBP, PLP, MOG), en el animal de experimentación (rata,

ratón, cobaya, mono...), y en la cepa del mismo utilizada (ratones SJL, C57/BL6...). Dependiendo de estas características, los modelos pueden variar en la reacción inmunológica, proceso inflamatorio y neuropatofisiología en SNC. Además, en relación con estos factores, la enfermedad puede ser aguda con recuperación espontánea (en ratones PL/J y B10.PL), crónica (sin recuperación, en C57BL6 inoculados con MOG) o crónica-recurrente (recaída tras recuperación, en SJL inoculados con PLP ó MBP); y cursar con desmielinización, más o menos acusada (Olsson, 1995). Tanto EM como EAE, son enfermedades que cursan con un daño inflamatorio, proceso que se desarrolla en varias fases secuenciales que se esquematizan en la figura 1.

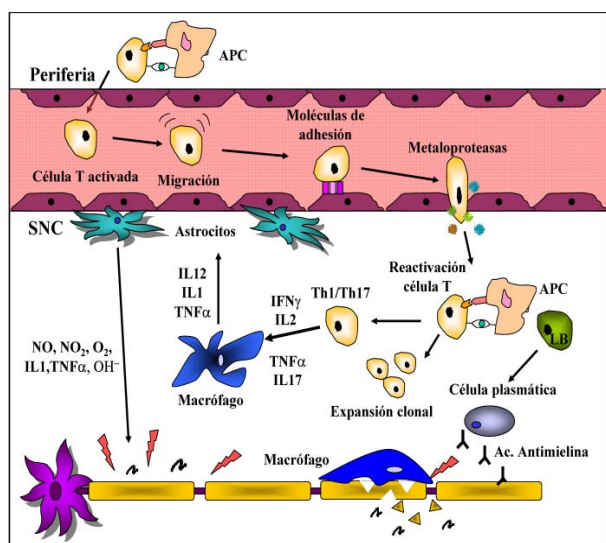


Figura 1.- El proceso de inflamación en EM y EAE se desarrolla en varios pasos secuenciales.

1: Activación de células CD4⁺ en periferia, migración por el torrente sanguíneo e infiltración en el SNC, favorecido por la expresión de moléculas de adhesión y metaloproteasas.

2: Reactivación de las células infiltradas, expansión clonal y producción de citoquinas proinflamatorias (TNFα, IFNγ e IL-17) que dan lugar a la activación de macrófagos, microglía, astrocitos y células endoteliales.

3: Desmielinización producida por reactivos de oxígeno, activación de complemento, ataque directo de macrófagos y producción de autoanticuerpos anti-mielina.

2.- CITOQUINAS IMPLICADAS EN EM Y EAE.

La producción de citoquinas participa en la respuesta inmune a través del control de la proliferación y activación de distintas estirpes celulares. Según el papel desempeñado por las citoquinas en la respuesta inmune inflamatoria en EAE, se puede dividir a éstas en dos grupos: proinflamatorias, que intervienen en la iniciación y progresión del fenómeno inflamatorio, y anti-inflamatorias que controlan la inflamación (Olsson, 1995).

2.1.- CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS.

La infiltración de células inmunes desde la periferia al SNC promueve la activación de células endoteliales, perivasculares, astrocitos y microglía residente que expresan MHC de clase II y presentan antígeno a linfocitos infiltrados. Estas células residentes y las propias células infiltradas son capaces de secretar diversos productos como reactivos de oxígeno, quimocinas y citoquinas, que amplifican la inflamación en el órgano diana.

Entre las citoquinas proinflamatorias implicadas en EAE y EM se encuentran las relacionadas con linfocitos T cooperadores (Th) de tipo 1 (Th1) y de tipo 17 (Th17).

- **IFN- γ** , es producido por linfocitos Th1 activados, células NK y linfocitos T citotóxicos, produce activación de macrófagos, diferenciación de células T y B, y modulación de la expresión de MHC de clase I y II. Activa la producción de IL-1, TNF α y NO en macrófagos (Collart *et al.*, 1986). Existen numerosos datos de la implicación de IFN- γ en el proceso patológico de EAE y EM, ya que su expresión en el SNC coincide con el máximo grado de EAE y disminuye en la fase de recuperación (Kennedy *et al.*, 1992; Renno *et al.*, 1994). En EM se han localizado células positivas para IFN- γ en lesiones (Hofman *et al.*, 1986) y se ha comprobado que en sangre periférica las células de pacientes producen mayor cantidad de IFN- γ que las de controles sanos (Beck *et al.*, 1988). Sin embargo, ratones deficientes en IFN- γ o en su receptor no son resistentes a EAE (Krakowski and Owens, 1996; Willenborg *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2000; Espejo *et al.*, 2002). Como revisaremos más adelante, estas discrepancias han sido mejor entendidas desde el análisis del papel de IL-17 en EAE y EM.

- **IL-12**, secretada principalmente por monocitos, macrófagos y células dendríticas, dirige a las células T *naïve* hacia el fenotipo Th1 (Segal *et al.*, 1998; Kim and Voskuhl, 1999). En EAE, el tratamiento con IL-12 acelera el curso de la enfermedad, mientras que anticuerpos anti-IL-12 la previenen (Leonard *et al.*, 1997; Bar-Or *et al.*, 1999; Alleva *et al.*, 2001). Sin embargo, ratones KO para la subunidad p35 (que compone junto a p40 la proteína IL-12) o para IL12R β 2 son susceptibles a padecer EAE (Gran *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Por tanto, aunque IL-12 presenta un papel crucial en EAE dirigiendo la respuesta Th1, no es la única citoquina responsable de desencadenar el daño inflamatorio a nivel de SNC.

- **IL-17**, producida por células Th17 activadas, está relacionada con la destrucción tisular en varios procesos autoinmunes, entre los que se incluye EM (Matusevicius *et al.*, 1999). El tratamiento con anti-IL17 protege de EAE, mientras que animales IL17^{-/-} manifiestan resistencia a la inducción de la enfermedad (Nakae *et al.*, 2003) (Langrish *et al.*, 2004). En el apartado 4.1 se revisará exhaustivamente el papel de esta citoquina en EAE y EM.

- **IL-23**, secretada por macrófagos y células dendríticas, está compuesta por las subunidades p19 y p40 (compartida por IL-12). Induce la secreción de IL-17 por parte de células T efectoras (Aggarwal *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003). En los últimos años se ha mostrado un papel relevante en el daño inflamatorio en EAE para IL-23. Ratones KO

para cada una de las subunidades que componen IL-23 han mostrado ser resistentes a la inducción de EAE (Cua *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005). Esta resistencia correlaciona con una pérdida de células productoras de IL-17 en el SNC (Langrish *et al.*, 2005).

- **TNF- α** , producido por células Th1, macrófagos y monocitos, regula el crecimiento y diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares. Existen datos sobre la existencia de una asociación específica entre su expresión y la patogenia de EM y EAE (Sharief and Hentges, 1991; Korner *et al.*, 1997; Akassoglou *et al.*, 1998; Kassiotis *et al.*, 1999). La mayor fuente de TNF- α en placas de EM y EAE son astrocitos y macrófagos (Okuda *et al.*, 1998; Bar-Or *et al.*, 1999; Juedes *et al.*, 2000). En un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa esta citoquina, se observó que los animales desarrollan de forma espontánea una enfermedad desmielinizante, con muerte apoptótica de oligodendrocitos y formación de placas de desmielinización (Probert *et al.*, 1995). Por otro lado, en ratones KO para TNF- α se observó una reducción en los infiltrados perivasculares y en la expansión de células infiltradas en SNC (Korner *et al.*, 1997).

2.2.- CITOQUINAS ANTI-INFLAMATORIAS.

Las principales citoquinas que han demostrado un papel protector en EAE y/o EM son IL-4, IL-10 y TGF- β .

- **IL-4** es una citoquina de acción pleiotrópica producida principalmente por linfocitos Th2 activados. En SNC suprime la expresión de MHC de clase II (Suzumura *et al.*, 1994) e induce la secreción de factor de crecimiento neuronal (Kwong *et al.*) por astrocitos (Brodie *et al.*, 1998). Produce diferenciación de células hacia Th2 e inhibe el desarrollo de células productoras de IFN- γ e IL-17 (Hsieh *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). El tratamiento con IL-4 en ratones donde se indujo EAE de forma pasiva, mostró protección a la enfermedad (Racke *et al.*, 1991; Kennedy *et al.*, 1992). Aunque no se ha encontrado una relación directa entre la expresión de IL-4 en SNC en EAE y la fase de recuperación de la enfermedad (Kennedy *et al.*, 1992), varios trabajos en animales KO adjudican un papel relevante a esta citoquina en la limitación de la EAE (Bettelli *et al.*, 1998; Falcone *et al.*, 1998; Zhao and Fritz, 1998).

- **IL-10** tiene como principal actividad la finalización de la respuesta inflamatoria. Su principal fuente son monocitos y macrófagos (de Waal Malefyt *et al.*, 1991), pero puede ser producida por linfocitos Th2 y en algunos casos por células Th17 y T reguladoras (Roncarolo *et al.*, 2001). También la pueden producir linfocitos Th1 para inmunorregular fuertes respuestas a agentes infecciosos (Anderson *et al.*, 2007; Jankovic

et al., 2007). IL-10 inhibe la producción de citoquinas y quimoquinas implicadas en inflamación, NO, prostaglandina E2, metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, y la expresión de antígenos MHC de clase II (Moore *et al.*, 2001). También inhibe la actividad de células CD4⁺ y células dendríticas implicadas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria (de Waal Malefyt *et al.*, 1993; Taga *et al.*, 1993; Schandene *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2001). En células CD8⁺, la IL-10 induce proliferación y aumento de la actividad citotóxica (Jinquan *et al.*, 1993; Groux *et al.*, 1998; Rowbottom *et al.*, 1999). Los primeros indicios del papel beneficioso de IL-10 en EAE surgen cuando se comprueba que la recuperación espontánea de EAE correlaciona con la expansión de células Th2 productoras de IL-4 y/o IL-10 (Kennedy *et al.*, 1992; Khoury *et al.*, 1992; Issazadeh *et al.*, 1995). Por otra parte, se ha determinado que la administración de IL-10 en EAE disminuye los síntomas de la enfermedad (Rott *et al.*, 1994; Nagelkerken *et al.*, 1997). Ratones KO para IL-10 desarrollan una enfermedad más severa que los ratones WT, viéndose en LNC una mayor proliferación y producción de citoquinas de tipo Th1. Además, la sobreexpresión de esta citoquina en ratones transgénicos hace a estos animales más resistentes a la enfermedad (Bettelli *et al.*, 1998). Estudios recientes, han mostrado que células Th17 polarizadas hacia ese fenotipo en ausencia de IL-23 producen IL-10 y son menos proinflamatorias (McGeachy *et al.*, 2007).

• **TGF-β** está relacionada con anti-inflamación en SNC (Unsicker *et al.*, 1991). En respuesta a inflamación del SNC, las células gliales aumentan la producción de TGF-β como mecanismo protector (Lindholm *et al.*, 1992; Logan *et al.*, 1992; Makwana *et al.*, 2007). En periodos de remisión de pacientes con EM, los niveles de TGF-β son elevados en líquido cefalorraquídeo y suero (Link *et al.*, 1994; Rieckmann *et al.*, 1994). En EAE, TGF-β retrasa y disminuye los síntomas de la enfermedad (Kuruvilla *et al.*, 1991; Racke *et al.*, 1991). *In vitro*, TGF-β suprime la proliferación de células CD4⁺ naïve (Kehrl *et al.*, 1986) y promueve la generación de células T reguladoras (Zheng *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Sin embargo, ratones que sobreexpresaban TGF-β en SNC demostraron un aumento en la severidad de la EAE (Wyss-Coray *et al.*, 1997). Este papel proinflamatorio podría ser explicado por el hecho de que TGF-β también dirige la diferenciación hacia Th17 en presencia de IL-6 (Bettelli *et al.*, 2006).

3.- PRINCIPALES TIPOS CELULARES IMPLICADOS EN EM Y EAE.

La EM y su modelo animal EAE son procesos mediados principalmente por **linfocitos T CD4⁺** autorreactivos, a los que dedicamos más adelante un apartado específico. Sin embargo, existen otros tipos celulares implicados en la enfermedad.

La activación de células T produce la secreción de citoquinas proinflamatorias responsables de promover daño tisular a través de la activación de otros tipos celulares como **linfocitos B**, los cuales juegan un papel importante en autoinmunidad a través de presentación antigénica a células T, secreción de anticuerpos y activación del complemento. Estos anticuerpos influyen en el desarrollo de la enfermedad favoreciendo la destrucción de mielina (Dalakas, 2006; Edwards and Cambridge, 2006; Nikbin *et al.*, 2007). La implicación de las células B en la patogenia de la EM, ha sido destacada por estudios que utilizan el anticuerpo monoclonal Rituximab, que reconoce CD20 en células B (Hauser *et al.*, 2008).

En otras áreas de investigación, la atención se ha centrado en el papel de células residentes del SNC como **astrocitos** y **microglía**, en la patogenia de la EM. Algunos estudios han sugerido que los astrocitos pueden contribuir a la limitada remielinización en lesiones de EM y pueden participar, al igual que la microglía, como células presentadoras de antígeno a linfocitos T auto-reactivos (De Keyser *et al.*, 2003). Este tipo celular a su vez, puede expresar moléculas de adhesión que facilitan la entrada de los linfocitos T en el SNC y, mediante la liberación de metaloproteasas, participan en la rotura de las uniones entre células vasculares endoteliales (Williams *et al.*, 2007).

Otro factor importante en la patogenia de EM y EAE es el estrés oxidativo. Tanto **macrófagos** como microglía activada, producen especies reactivas de oxígeno y han sido implicados en desmielinización y daño axonal en ambas patologías. Por otra parte, la producción de glutamato por macrófagos también participa en el daño axonal y muerte de oligodendrocitos (Werner *et al.*, 2001). Además, se ha visto un aumento en los niveles de glutamato en el líquido cefalorraquídeo asociado a la severidad y el curso de la EM (Stover *et al.*, 1997; Stover *et al.*, 1997; Barkhatova *et al.*, 1998).

También existen evidencias de la participación de **células T CD8⁺** en EM y EAE. Se han encontrado casos en que existe una mayor proporción de células CD8⁺ que de CD4⁺ en lesiones de EM (Traugott *et al.*, 1983; Babbe *et al.*, 2000). La depleción simultánea de células CD4⁺ y CD8⁺ en pacientes de EM, disminuye la frecuencia de aparición de nuevos brotes y lesiones (Coles *et al.*, 1999; Paolillo *et al.*, 1999). Sin embargo, esto no se observa al deplecionar únicamente linfocitos T CD4⁺ (Lindsey *et al.*,

1994; van Oosten *et al.*, 1997). Algunas investigaciones iniciales sobre linfocitos T CD8⁺ en EAE adscribieron un papel beneficioso a estas células, ya que en ratones KO para CD8, la transferencia de células T CD8⁺ exógenas con especificidad antigénica no definida actuaron como supresoras de la enfermedad (Jiang *et al.*, 1992; Koh *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1992). Sin embargo, posteriormente se obtuvieron datos que refuerzan la hipótesis del papel patogénico de células T CD8⁺ en EAE, y se han desarrollado modelos animales que utilizan células T CD8⁺ reactivas a mielina para la inducción de autoinmunidad en sistema nervioso central (Huseby *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001). En modelos animales de inducción de EAE por células CD4⁺ o CD8⁺ se han encontrado diferencias en los mecanismos efectores. La utilización de agentes bloqueantes de citoquinas responsables de daño en EAE (TNF- α e IFN- γ), ha mostrado diferencias entre EAE inducida por CD4⁺ o CD8⁺. En EAE inducida por células CD4⁺ la enfermedad remite al tratar con anticuerpos anti-TNF- α o bloqueando el receptor de TNF (TNFR) (Liu *et al.*, 1998; Steinman, 1999). Sin embargo, en la inducción por CD8⁺ el bloqueo de TNFR no tiene efecto, y en EM este tratamiento agrava la enfermedad (Group, 1999). Por otra parte, en EAE inducida por CD8⁺, suministrar anticuerpo anti-IFN- γ reduce la sintomatología (Huseby *et al.*, 2001), mientras que la empeora en EAE inducida por CD4⁺ (Duong *et al.*, 1992). Estos datos indican que ninguno de los modelos de EAE refleja todos los aspectos de la EM aunque cada uno de ellos es de utilidad para el estudio del proceso autoinmune e inflamatorio.

A pesar de los distintos tipos celulares implicados en esta patología, el tipo celular más conocido como iniciador de la enfermedad, y en el que nosotros hemos centrado nuestro trabajo de experimentación, ha sido el de linfocitos T CD4⁺.

4.- LINFOCITOS T CD4⁺ Y SU PAPEL EN EM Y EAE.

Mediante el proceso de presentación antigénica la célula T *naïve* reconoce el antígeno para el cual su receptor (TCR) es específico. Este antígeno es presentado en membrana por la célula presentadora de antígeno mediante los complejos principales de histocompatibilidad (MHC en ratón y HLA en humano) de clase I para células T CD8⁺, y de clase II para células T CD4⁺. Mediante este proceso la célula T prolifera y produce citoquinas y quimoquinas que activan y reclutan otras células del sistema inmune. La cascada de transducción de señales intracelulares culmina en la activación de factores de transcripción que están presentes (para facilitar una rápida respuesta celular), pero inactivos, en el linfocito en reposo. Estos factores están implicados en la transcripción de

los efectores de respuesta inmune (citoquinas, quimoquinas...). Aunque no podemos revisar exhaustivamente aquí el proceso de activación de la célula T, para lo que referimos a (Smith-Garvin *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010), queremos hacer referencia a algunos de los factores de transcripción implicados en la activación de linfocitos T, ya que han sido objeto de estudio en parte de nuestro trabajo experimental por su posible implicación en EAE.

Uno de los más importantes es **NFAT** (nuclear factor of activated T cells). Permanece inactivo en el citoplasma de la célula en reposo en un estado hiperfosforilado. Es una familia de cinco miembros (NFAT1-5) regulados por aumento del calcio intracelular, que estimula la fosfatasa calcineurina, la cual defosforila los residuos de serina de NFAT, exponiendo una señal de localización nuclear y permitiendo su translocación al núcleo, revisado en (Hermann-Kleiter and Baier, 2010). En el modelo de EAE se ha propuesto que la inhibición de NFAT puede estar implicada en la disminución de la severidad de la enfermedad (Jung *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque existen trabajos en los que una reducida translocación nuclear de NFAT da lugar a una disminución de la proliferación de linfocitos T, no demuestran que este hecho sea el responsable de la disminución de los síntomas de EAE (Ren *et al.*, 2008).

Por otra parte, **NF- κ B** (nuclear factor κ B) también regula la expresión de una gran variedad de genes involucrados en respuestas inmunes e inflamatorias, proliferación y supervivencia celular. Su activación induce la expresión de citoquinas, quimoquinas y moléculas de adhesión que median la activación de células inmunes, aunque también protege de otras citoquinas que inducen muerte celular por inducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas (Karin and Lin, 2002). La red de efectos de señalización de NF- κ B en enfermedades inflamatorias probablemente está determinada por el balance entre las actividades proinflamatorias y antiapoptóticas. Consta de cinco miembros: p65 (Rel A), c-Rel, Rel-B, p50/p105 y p52/p100 que homo y heterodimerizan (Ghosh *et al.*, 1998). En el linfocito T en reposo, se encuentra en el citoplasma interaccionando con las proteínas inhibitorias I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ). Tras la activación de la célula T a través del TCR (u otros estímulos como TNF- α o IL-1) I κ B es fosforilado por IKK y degradado vía proteosoma, lo que posibilita la translocación al núcleo de NF- κ B. La activación de NF- κ B en células inmunes periféricas es esencial para la inducción de EAE (Hilliard *et al.*, 2002). Además, estudios realizados en EAE con distintos tratamientos como dehydroepiandrosterona, Rolipram o IFN β produjeron una disminución en la

activación de NF- κ B que correlaciona con una mejora en la EAE (Du *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2005; Martin-Saavedra *et al.*, 2007).

Una vez desencadenada la respuesta de la célula T, las citoquinas producidas pueden actuar de forma autocrina, o estimular la producción de citoquinas por otros tipos celulares que a su vez actúan sobre la célula T. Las proteínas Stat (signal transducers and activators of transcription) participan en la activación celular mediada por interleuquinas, y transducen señal a través de las proteínas Jak (Janus Kinasas). La familia STAT consta de 7 miembros, que bajo fosforilación dimerizan y entran en el núcleo, donde activan o reprimen transcripción (Ivashkiv and Hu, 2004). **Stat6** transduce la señal que desencadenan IL-4 e IL-13 (Hebenstreit *et al.*, 2006). La deficiencia de Stat6 da lugar a una defectuosa respuesta Th2, con disminución de la diferenciación de este tipo celular, de la producción de IgE y de la respuesta proliferativa a IL-4 (Shimoda *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1996). El tratamiento de EAE con IFN β produce un aumento de este factor de transcripción (Martin-Saavedra *et al.*, 2007), además se ha propuesto una implicación de Stat6 en el desarrollo de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Sanchez-Guajardo *et al.*, 2007). Por otra parte, recientemente se ha publicado que la ausencia de Stat6 en ratones, aumenta su susceptibilidad a EAE (Wang *et al.*, 2009).

En animales y humanos sanos existen células T CD4⁺ auto-reactivas, por lo que es posible que la enfermedad autoinmune se deba a una activación errónea de estas células (de Rosbo and Ben-Nun, 1998; Anderson *et al.*, 2000). En EAE y EM estas células responden a antígenos de la membrana mielínica, sistema de membranas proteolípicas que envuelve los axones neuronales y está constituida por proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípica (PLP) y glicoproteínas asociadas a mielina y al oligodendrocito y mielina (MOG) (de Rosbo and Ben-Nun, 1998). Estas proteínas se localizan en sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), a excepción de MOG que solo se presenta en el SNC, siendo expresadas en oligodendrocitos (Berger *et al.*, 1997).

Las células T CD4⁺ son generadas en timo, donde se seleccionan positiva y negativamente de acuerdo a la afinidad de su TCR (Ladi *et al.*, 2006). A periferia salen dos tipos de células CD4⁺: i) las que al reconocer antígeno darán lugar a células T cooperadoras efectoras en la respuesta inmune (*T helper*, Th), y ii) las denominadas células T reguladoras naturales (nTreg), que expresan en superficie constitutivamente altos niveles de CD25 (cadena α del receptor de IL-2), el cual en células efectoras sólo es expresado bajo activación. Las células nTreg ejercen una acción supresora sobre la actividad de células efectoras, constituyendo uno de los principales reguladores negativos

de autoinmunidad e inflamación. Se sabe que en periferia, bajo determinadas condiciones ambientales, como la influencia de TGF- β y ácido retinoico, células CD4⁺ *naïve* pueden dar lugar a células Treg Foxp3⁺ con actividad supresora sobre células efectoras. Esta fracción celular se denomina células Treg inducidas o adaptativas (iTreg) (Chen *et al.*, 2003; Housley *et al.*, 2009). En la figura 2 se esquematiza el desarrollo y función de los distintos tipos de células CD4⁺.

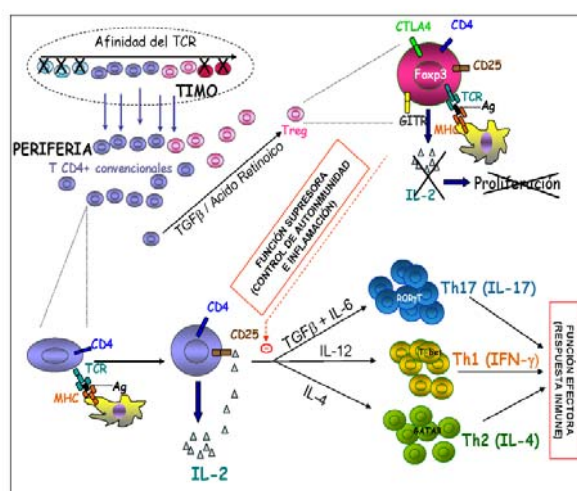


Figura 2.- En periferia la célula CD4⁺ convencional al reconocer antígeno se activará produciendo IL-2 y proliferando. El ambiente citoquínico condicionará la diferenciación hacia cada uno de los tres fenotipos efectoras de T helper. Las células Treg CD4⁺Foxp3⁺ no proliferan y su función es la de suprimir la proliferación de las células efectoras. (Para más detalles ver texto).

4.1.- LINFOCITOS T COOPERADORES.

La diferenciación de células CD4⁺ *naïve* hacia células efectoras Th es iniciada por activación a través del TCR y por moléculas coestimuladoras en presencia de citoquinas específicas. Durante años, las células Th, fueron clasificadas en 2 subtipos: Th1 y Th2; paradigma introducido por Mosmann & Coffman hace 25 años y que ayudó a explicar muchos fenómenos en la inmunidad adaptativa (Mosmann *et al.*, 1986). Los linfocitos Th1 activan macrófagos y producen una respuesta inmune celular de defensa contra patógenos intracelulares como virus y bacterias. Por otra parte, las células Th2 inducen a la producción de anticuerpos por células B para la respuesta inmune humoral de protección frente a parásitos extracelulares como los nemátodos y helmintos.

El paradigma Th1/Th2 ha sido revisado por el descubrimiento de un tercer subtipo de células T CD4⁺ que producen IL-17 y presentan una función efectora diferente de Th1 y Th2, denominadas Th17 (Korn *et al.*, 2009). Actualmente se sabe que la célula CD4⁺ *naïve* al reconocer antígeno se diferenciará a uno de los tres subtipos Th dependiendo del ambiente citoquínico. De manera que la presencia de IL-12, IL-4, o la combinación de IL-6 y TGFβ, dará lugar respectivamente a los fenotipos Th1, Th2 o Th17 (Fig. 2) (Zhu *et al.*, 2010).

Los fenotipos Th1 y Th17 producen interleuquinas proinflamatorias como IL-2, IFN- γ y TNF- α , características de Th1, e IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, producidas por Th17. Los linfocitos Th2 secretan citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (Mosmann *et al.*, 1986; Ouyang *et al.*, 2008; Zhu and Paul, 2010). Las citoquinas producidas por cada subtipo antagonizan entre sí, siendo por lo tanto, Th1, Th2 y Th17 fenotipos excluyentes. La generación de cada uno de estos linajes celulares está dirigida por cambios de conformación en la estructura de cromatina que determinan la expresión o silenciamiento de los genes característicos para cada fenotipo (Zhu *et al.*, 2010). Existen factores de transcripción “*master*” que se expresan exclusivamente en cada uno de los subtipos Th y dirigen sus programas transcripcionales: T-bet para Th1, GATA-3 para Th2, y ROR γ t y ROR α para Th17 (Zheng and Flavell, 1997; Szabo *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008).

La principal función conocida de IL-17 es la protección extracelular contra bacterias y hongos en las mucosas de tractos gastrointestinal, urogenital y respiratorio (Gaffen, 2008) y su principal acción de defensa es el reclutamiento de neutrófilos (Laan *et al.*, 1999; Linden *et al.*, 2005). De particular importancia para la actividad de células Th17 es la citoquina IL-23, que, aunque no es necesaria para la generación del fenotipo, se requiere para la estabilización del mismo (Stritesky *et al.*, 2008). La actividad Th17 está influenciada por otras citoquinas como IL-21 (también producida por células Th17) que, mediante un mecanismo de retroalimentación, favorece el desarrollo de este linaje, mientras que IL-27, IL-4, IFN- γ , IL-25 e IL-2 limitan el fenotipo Th17 (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005; Kleinschek *et al.*, 2007; Stumhofer *et al.*, 2007). Además de IL-17A e IL-21, las células Th17 secretan IL-17F e IL-22, que cooperan en la inducción de inflamación y en el reclutamiento de neutrófilos (Kimura *et al.*, 2007; Kreamborg *et al.*, 2007).

Además de proteger frente a patógenos, los distintos subtipos Th están implicados en diferentes procesos patogénicos. El subtipo Th2 está implicado en procesos alérgicos y de asma atópica (Mosmann *et al.*, 1986; Barnes, 2008), mientras que los subtipos Th1-Th17 predominan en enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide (AR), así como en la psoriasis (Teunissen *et al.*, 1998; Harrington *et al.*, 2005; Sospedra and Martin, 2005). Hasta el descubrimiento del fenotipo Th17 se había adjudicado la responsabilidad de la iniciación de EAE a linfocitos CD4⁺ autorreactivos Th1 (Okuda *et al.*, 1998). Sin embargo, existían datos que no podían ser explicados por dicha hipótesis. Por ejemplo, la depleción del receptor de IL-12, principal

inductor de Th1, aumenta la susceptibilidad a EAE (Ferber *et al.*, 1996; Krakowski and Owens, 1996). Tampoco se ajusta al paradigma Th1/Th2 como inductor/protector de EAE el hecho de que ratones deficientes en IFN- γ o en su receptor, no poseen resistencia a autoinmunidad (Krakowski and Owens, 1996; Willenborg *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2000; Espejo *et al.*, 2002). Actualmente se sabe que el fenotipo Th17 participa activamente en la inducción de EAE (Langrish *et al.*, 2005), ya que ensayos de neutralización de IL-17 (Hofstetter *et al.*, 2005; Komiyama *et al.*, 2006), o de bloqueo de citoquinas como TGF- β e IL-6 ó IL-23 e IL-1 conlleva una atenuación en la enfermedad (Gijbels *et al.*, 1995; Cua *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005; Steinman, 2007; Korn *et al.*, 2009). Además, ensayos con ratones deficientes en la cadena p19 de IL-23, o de neutralización de IL-23, demuestran una deficiencia en la producción de IL-17 y una alta resistencia a EAE (Cua *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Awasthi and Kuchroo, 2009; McGeachy *et al.*, 2009). Por otra parte, IL-27, regulador negativo de IL-17, puede prevenir desmielinización en EAE (Chen and O'Shea, 2008; Guo *et al.*, 2008).

En los últimos años también se ha evidenciado la implicación de las células Th17 en EM. Por ejemplo, las células endoteliales de individuos con EM expresan altos niveles de receptores de IL-17 y responden mejor a esta citoquina (Kebir *et al.*, 2007). Además, se han identificado receptores de IL-17 en placas de pacientes con EM aguda y crónica (Tzartos *et al.*, 2008). Sin embargo, estos datos solo aportan la evidencia de que otro fenotipo celular, además de Th1, es capaz de inducir esta enfermedad autoinmune puesto que ambos fenotipo Th17/Th1 contribuyen al proceso de la enfermedad. Por ejemplo, cuando el ratio Th17/Th1 es alto, se da una EAE más intensa en el cerebro, mientras que la inflamación se centra en la médula espinal cuando dicho ratio es menor (Stromnes *et al.*, 2008).

4.2.- CÉLULAS T REGULADORAS.

Otro tipo celular implicado en el control de los procesos de EAE y EM es el fenotipo de células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). Se distinguen por la expresión del factor nuclear forkhead box P3 (Foxp3), factor de transcripción fundamental en el desarrollo y función de este tipo celular (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003). También poseen marcadores de membrana típicos, pero no específicos, como CD25, CTLA-4, TGF- β , o CD62L^{high} (Sakaguchi *et al.*, 1995; Shevach, 2002). En humanos y ratones representan el 5-10% de las células CD4⁺ periféricas. Se caracterizan por ser anérgicas (incapaces de proliferar o secretar IL-2 tras la activación del TCR) y por inhibir

la proliferación de células T tanto *in vivo* como *in vitro* (Wing *et al.*, 2003; Baecher-Allan and Hafler, 2006) de manera dependiente del TCR (Thornton and Shevach, 2000). La existencia de células Treg constituye un mecanismo para controlar los procesos de autoinmunidad suprimiendo la activación y expansión de células autorreactivas (Sakaguchi, 2004; McGeachy *et al.*, 2005; Sakaguchi *et al.*, 2006; Stephens *et al.*, 2009). Por otra parte, tienen la función de controlar una proliferación excesiva de las células efectoras en respuestas no autoinmunes, por lo que complementan a otros mecanismos como la anergia inducida por activación para evitar una respuesta inmune exagerada (Thornton and Shevach, 1998). También están implicadas en la supresión de alergia y asma (Akbari *et al.*, 2003). Otra de las funciones importantes de las células Treg es la de inducir tolerancia a antígenos de la dieta (Karlsson *et al.*, 2004; Frisullo *et al.*, 2009).

Además de las células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) se han descrito varios tipos de células T con actividad supresora sobre células efectoras, como Tr1 y Th3. Las Tr1, son células reguladoras CD4⁺CD25⁻ que expresan altos niveles de IL-10 y bajos niveles de TGF-β e IFN-γ, presentan CTLA-4 en superficie, pero no expresan Foxp3. Pueden ser inducidas *in vitro* por estimulación de CD4⁺ *naïve* con IL-10 (Levings *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003). Las células Th3 expresan CTLA-4 en superficie y se caracterizan por una alta producción de TGF-β (Faria and Weiner, 2005).

Los principales mecanismos propuestos para la acción de células Treg son: i) por contacto célula-célula y citolisis mediada por granzima y perforina, ii) mediante factores solubles como IL-10 o TGF-β, iii) compitiendo con células T efectoras por la IL-2. Estas acciones se ejercen tanto sobre células T CD4⁺ efectoras, como sobre otros tipos celulares como natural killer y células dendríticas, bloqueando moléculas coestimuladoras o disminuyendo la presentación antigénica (Shevach, 2002).

En EAE se ha demostrado una regulación mediada por células Treg. La transferencia de células CD4⁺CD25⁺ previamente a la inducción activa de EAE reduce significativamente la severidad clínica de la enfermedad (Kohm *et al.*, 2002). El hallazgo de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en lesiones de SNC en EAE sugiere que estas células median la fase de recuperación de la enfermedad. Además, la depleción de células Treg en animales enfermos conduce a un aumento de la gravedad de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2004; McGeachy *et al.*, 2005; Stephens *et al.*, 2009). El papel de estas células también es importante en EM. Se ha demostrado que células T CD4⁺CD25^{high} humanas, similares a las células CD4⁺CD25⁺ supresoras murinas, son anérgicas a la estimulación *in vitro* e inhiben la proliferación de células T (Baecher-Allan *et al.*, 2001). La actividad supresora

de células $CD4^+CD25^{high}$ aisladas de pacientes de EM es menor que la mediada por las obtenidas de controles sanos, aunque la frecuencia de aparición de células $CD4^+CD25^{high}$ encontrada en sangre es similar, lo que indica una baja funcionalidad de células Treg en EM en presencia de dosis fisiológicas de antígeno y no una deficiencia en el número de células (Putheti *et al.*, 2004; Viglietta *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2005). Estudios longitudinales de tratamiento con IFN β en pacientes de EMRR durante 6 meses, revelaron una restauración de la función supresora de las células reguladoras (de Andres *et al.*, 2007; Korporal *et al.*, 2008; Namdar *et al.*, 2010).

4.3.- REGULACIÓN DEL BALANCE Th17/Treg.

Como ya hemos comentado, las células Treg $Foxp3^+$ siguen una ruta de desarrollo divergente al establecimiento de IL-17, aunque ambas alternativas son gobernadas por TGF- β . La dicotomía entre células Th17 y $Foxp3^+$ fue demostrada por primera vez por (Bettelli *et al.*, 2006), quien determinó que IL-6 inhibe la generación de células Treg $Foxp3^+$ inducida por TGF- β , y que los fenotipos Th17 y Treg $Foxp3^+$ son mutuamente excluyentes (Bettelli *et al.*, 2006) (Fig. 3).

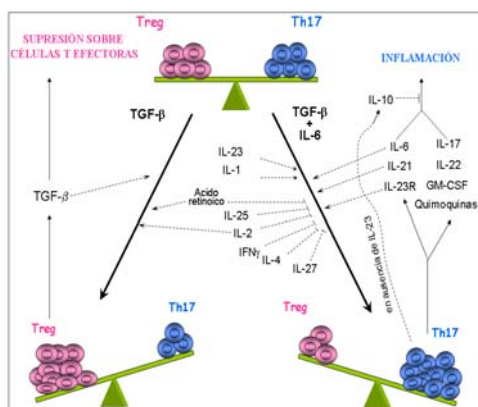


Figura 3.- La homeostasis de células Treg y Th17 puede ser desequilibrada dependiendo del ambiente citoquinico. TGF- β está involucrado en ambas rutas, y es IL-6 la citoquina decisiva que dirige el destino del subtipo celular. Una vez que se ha adquirido compromiso hacia Th17, se empieza a expresar el receptor de IL-23 que estabiliza el fenotipo. La figura recoge un resumen de los distintos reguladores positivos y negativos que actúan sobre ambas rutas.

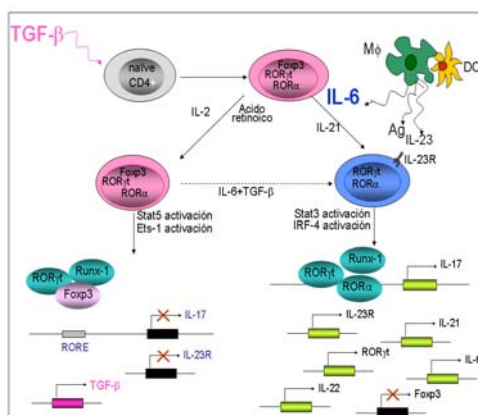


Figura 4.- La generación de células Treg y Th17 es antagónica pero comparten un programa genético intrínseco. En ausencia de IL-6 TGF- β activa la expresión de Foxp3 y de ROR γ T. ROR γ T y Runx-1 son secuestrados por Foxp3, evitándose el contacto con el promotor de IL-17. La señalización de IL-6 activa Stat3 y ROR γ T, y suprime la interacción con Foxp3 llevando a la expresión de IL-17, IL-23R e IL-21, amplificando y estabilizando el fenotipo Th17.

TGF- β es capaz de inducir la expresión tanto de ROR γ t como de Foxp3, involucrados en los respectivos programas genéticos de Th17 y Treg. No obstante, TGF- β

no inicia la diferenciación a Th17 a menos que también estén presentes IL-6 ó IL-21 (Ichiyama *et al.*, 2008). En ausencia de estos factores proinflamatorios Foxp3 secuestra a ROR γ t y Runx-1 e impide la transactivación del gen de IL-17 (Zhang *et al.*, 2008) (Fig. 4).

IL-6, IL-21, IL-1 e IL-23 son capaces de liberar a ROR γ t de la inhibición de Foxp3 y activar Stat3 e IRF-4, factores de transcripción que también son críticos en el establecimiento de IL-17 (Zhang *et al.*, 2008). Este programa transcripcional lleva a la expresión del receptor de IL-23, permitiendo que IL-23 actúe como estabilizador del fenotipo Th17. Sin embargo, células polarizadas hacia este fenotipo en presencia de TGF- β e IL-6 y en ausencia de IL-23, son capaces de producir IL-10 además de IL-17 lo que disminuye su potencial patogénico en EAE (McGeachy *et al.*, 2007).

Esta regulación en el balance de Th17/Treg adquiere un grado más de complejidad por la plasticidad que presentan los programas genéticos de Th17 y Treg. Mientras que los cambios epigenéticos que llevan a la diferenciación de células Th1 y Th2 evitan su conversión a otros fenotipos, se ha descrito que las células Th17 generadas en presencia de IL-6 y TGF- β son inestables y tienen capacidad para convertirse en Th1 bajo los estímulos adecuados (Peck and Mellins, 2009). Por otra parte, actualmente está bien establecido que las células Treg pueden dirigirse hacia el fenotipo Th17 (Ayyoub *et al.*, 2009; Deknuydt *et al.*, 2009; Leveque *et al.*, 2009).

5.- TRATAMIENTOS EN EAE/EM.

Actualmente, las estrategias terapéuticas para EM se basan principalmente en el intento de regular la respuesta inmune. Aunque durante muchos años, el tratamiento con corticoides se empleó como único tratamiento para las manifestaciones inflamatorias producidas en los brotes de EM, actualmente se dispone de nuevas estrategias terapéuticas, como son IFN β (Jacobs *et al.*, 1981), acetato de Glatirámico (GA), Mitoxantrona (MTX) y Natalizumab (Conway and Cohen, 2010). Algunos de los tratamientos que aún están en fase de estudio son las estatinas (Sena *et al.*, 2003; Vollmer *et al.*, 2004) y los inhibidores de PDE, entre otros (Okuda *et al.*, 1996; Dinter, 2000; Sanchez *et al.*, 2005; Paintlia *et al.*, 2008). Aunque centraremos este apartado en los tratamientos que han sido objeto de nuestro trabajo experimental (IFN β e inhibidores de PDE), también queremos hacer breve referencia a algunos otros tratamientos actuales prometedores.

El **GA** es un péptido sintético creado por polimerización de la L-alanina, L-glutámico, L-lisina y L-tirosina, que tiene una estructura parecida a la de la proteína básica de la mielina. En principio se ensayó su capacidad encefalitógena, pero sorprendentemente mostró un efecto supresor más que inductor de la enfermedad, (La Mantia *et al.*, 2010). Su mecanismo de acción podría estar relacionado con efectos inmunológicos tales como inducción de células supresoras, inhibición de la presentación del antígeno o la desviación inmune de las células CD4⁺ desde el fenotipo Th1 al Th2 (Goodkin *et al.*, 1987; Likosky *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1998). Este compuesto reduce los brotes en EM y prolonga el tiempo entre los mismos, aunque no evita la progresión de la enfermedad. No suele producir los síntomas gripales o de cansancio a menudo asociados a otros tratamientos de la EM.

La estrategia de impedir la migración de los linfocitos al sistema nervioso central con **natalizumab** (anticuerpo monoclonal dirigido a la integrina alfa-4-beta-1 o VLA-4) es una opción que puede reducir hasta en un 70 por ciento los brotes de la enfermedad. Natalizumab inhibe la migración de células inmunes al parénquima inflamado de órganos linfáticos y al SNC. Bloquea la interacción de VCAM-1 con su ligando VLA-4 en células endoteliales evitando la migración de los leucocitos mononucleares a través del endotelio hacia el tejido inflamado (Yednock *et al.*, 1992). Sin embargo, conlleva el riesgo de desarrollar una leucoencefalopatía multifocal progresiva.

Las **estatinas**, además de disminuir el colesterol inhibiendo la enzima 3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, poseen un efecto inmunomodulador que puede ser de utilidad en el tratamiento de EM (Youssef *et al.*, 2002; Paintlia *et al.*, 2004). Este efecto inmunomodulador incluye el mantenimiento de la integridad de la Barrera Hematoencefálica (BHE) y la inhibición de la entrada de células inflamatorias a SNC (Stanislaus *et al.*, 2001). Algunas observaciones sugieren que las estatinas también pueden mediar neuroprotección y neuroregeneración (Paintlia *et al.*, 2005).

MTX es un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado para el tratamiento del cáncer y que posee un efecto inmunosupresor en EAE (Ridge *et al.*, 1985). Ejerce su acción antineoplásica intercalándose en las hebras de DNA y produciendo residuos fragmentados y entrecruzados de DNA. Muestra unos efectos secundarios mínimos en el momento de su administración. Sin embargo, posee un cierto riesgo de toxicidad cardíaca.

Ensayos con el anticuerpo monoclonal **Rituximab**, dirigido a la molécula CD20 en linfocitos B, han llevado a una reducción significativa de brotes en pacientes con RRMS (Hauser *et al.*, 2008).

5.1.- INTERFERÓN β COMO TRATAMIENTO PARA EAE Y EM.

El IFN β es una de las terapias más utilizadas en EM desde que diversos ensayos clínicos demostraron que disminuye la tasa de recaídas, la acumulación de discapacidad y la carga de lesiones medidas por resonancia magnética (Jacobs *et al.*, 1981; Lafaille, 1998; Luca *et al.*, 1999; Kuchroo *et al.*, 2002; Lily *et al.*, 2004; Langrish *et al.*, 2005). Los IFN son citoquinas con acciones antivirales, antitumorales, antiproliferativas e inmunomoduladoras (Stark *et al.*, 1998; Taki, 2002). Se clasifican en: tipo I, IFN α e IFN β (producidos por leucocitos y fibroblastos); y tipo II, IFN γ (producido principalmente por linfocitos Th1 y células NK) (Stark *et al.*, 1998). El efecto terapéutico de IFN β en EAE puede estar relacionado con su actividad sobre distintos tipos celulares del sistema inmune. Es bien conocido su efecto antiproliferativo en linfocitos T y que reduce la producción de IFN- γ y TNF- α en macrófagos y microglía (Noronha *et al.*, 1993; Pette *et al.*, 1997; Bongioanni *et al.*, 1999). Inhibe la presentación antigénica (Prieto and Lema, 2003). Disminuye la migración de linfocitos a través del endotelio por inhibición de moléculas LFA-1 y VLA-4; y sus ligandos VCAM-1 e ICAM-1 (Dhib-Jalbut *et al.*, 1996), así como la síntesis de quimoquinas que regulan la infiltración de linfocitos en los tejidos inflamados (Berman *et al.*, 1996; Prieto and Lema, 2003). Además de estos datos obtenidos *in vitro*, existen diversas pruebas del poder terapéutico de IFN β en los modelos de EAE. En algunos casos se ha relacionado la mejoría de los animales bajo tratamiento, con disminución en la expresión de ICAM y VCAM en linfocitos, reduciendo su adhesión y previniendo la infiltración al SNC (Floris *et al.*, 2002). En otros casos se ha observado una modulación en la expresión de interleuquinas pro y anti-inflamatorias (Yasuda *et al.*, 1999; Tuohy *et al.*, 2000). Por otra parte, ratones KO para IFN β son más susceptibles a EAE que ratones WT, y presentan un aumento de la función de linfocitos T, de la activación de la microglía y de la producción de TNF- α (Teige *et al.*, 2003).

Sin embargo, el mecanismo concreto por el que IFN β ejerce su acción beneficiosa *in vivo* no está todavía bien definido. Además, la terapia con IFN β no es totalmente eficaz y un importante porcentaje de pacientes no responde al tratamiento (Rio *et al.*, 2006; Bertolotto and Gilli, 2008). Por ello, existe gran interés en determinar los mecanismos de control de la enfermedad por IFN β . Recientemente, se ha propuesto que la eficacia del tratamiento con IFN β podría depender del tipo celular que desencadena la enfermedad, Th1 o Th17. En experimentos de inducción pasiva de EAE se encontró que IFN β es eficaz solo en el caso de que las células utilizadas para inducir la enfermedad hubieran

sido previamente cultivadas en condiciones propicias para Th1 (Axtell *et al.*, 2010). Por otra parte, nuestro grupo, ha descrito que el tratamiento con IFN β reduce y retrasa los síntomas en EAE activa, disminuyendo los infiltrados perivasculares propios de la enfermedad (Fig. 5). Este efecto correlacionó con una inhibición del factor de transcripción NF- κ B, un aumento de la citoquina Th2 IL-4 y de su principal transductor de señal (Stat6). En el mismo trabajo se hipotetizó que el efecto de IFN β podría estar relacionado con una disminución de la expresión de IL-17 (Martin-Saavedra *et al.*, 2007). Otros autores han adjudicado a IFN β un incremento en la producción de IL-27, regulador negativo del Th17 (Guo *et al.*, 2008), o una restauración de la función supresora de las células reguladoras (de Andres *et al.*, 2007; Korporeal *et al.*, 2008; Namdar *et al.*, 2010).

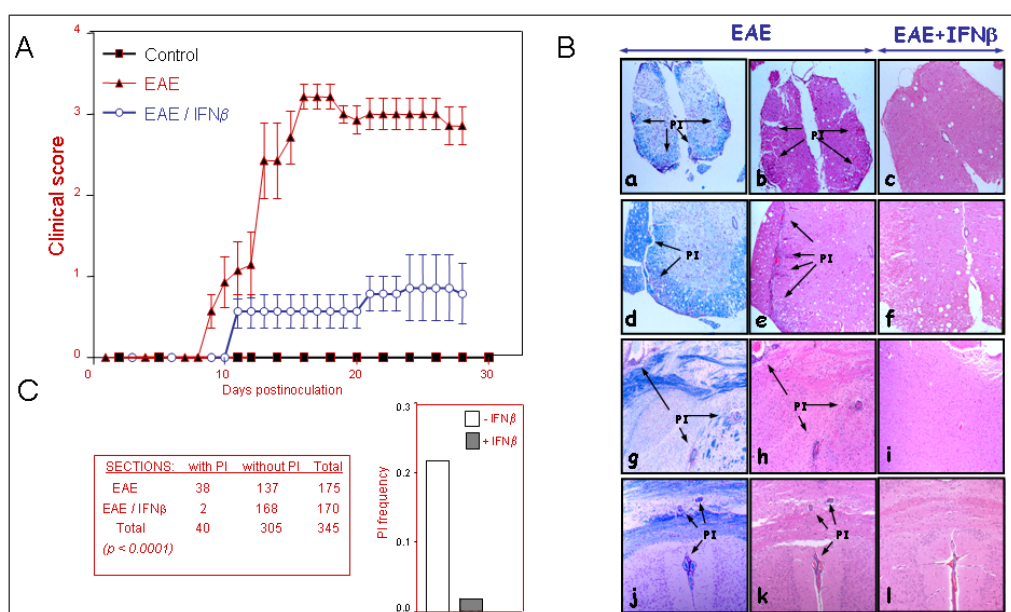


Figura 5: IFN β disminuye los síntomas de la inducción activa de EAE-MBP en ratones SJL y reduce la inflamación en SNC. A: Grado de la enfermedad seguido en grupos de ratones SJL establecidos por administración de vehículo (control), MBP (EAE) y MBP+IFN β (EAE/IFN β). B: Tinciones hematoxilina-eosina de secciones de SNC de animales EAE o EAE/IFN β sacrificados a día 9 p.i. Las secciones teñidas corresponden a médula espinal (a,b,c,d,e,f), tálamo (g,h,i) y comisura dorsal (j,k,l). Las flechas indican infiltrados perivasculares (PI). C: Cuantificación de secciones Positivas y negativas para infiltrados en ratones EAE o tratados con IFN β . (Figura extraída de Martin-Saavedra *et al.*, 2007).

5.2.- INHIBIDORES DE PDE COMO TRATAMIENTO PARA EAE Y EM.

Otra de las alternativas que se analiza desde hace años como terapia anti-inflamatoria en enfermedades de SNC, es la **inhibición de fosfodiesterasas (PDEs)** (Vandenbroeck *et al.*, 1999). Las PDEs son una familia de enzimas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc (Conti and Beavo, 2007). Los niveles intracelulares de estos nucleótidos se regulan a nivel de síntesis por las Adenilato y Guanilil Ciclasas; y a nivel de degradación por las PDEs. La inhibición de PDEs permite que el AMPc y GMPc actúen como segundos mensajeros en transducción de señales intracelulares,

mediando la acción de hormonas, neurotransmisores y otros efectores celulares. La principal diana del AMPc es la proteína kinasa A (PKA) (Torgersen *et al.*, 2002), entre cuyas acciones destaca la fosforilación de los factores de transcripción CREB (cyclic AMP response element binding protein) (Shaywitz and Greenberg, 1999), que se unen a elementos de DNA en los promotores de genes que responden a AMPc. Este factor de transcripción se une a DNA en elementos CRE (cyclic AMP response element), interaccionando con otros miembros de la superfamilia de factores de transcripción CREB/ATF (Hoeffler *et al.*, 1988; Gonzalez and Montminy, 1989; Habener *et al.*, 1990). En células en reposo, CREB aparece en el núcleo en su forma defosforilada que es inactiva (Gonzalez *et al.*, 1989), la fosforilación del residuo de serina 133 promueve la asociación de CREB con CBP (CREB binding protein) y la actividad transcripcional. En un análisis de la variación en los niveles de fosforilación de CREB en médula de rata Lewis durante EAE, se encontró un aumento de estos niveles en SNC en el pico de EAE, mientras que disminuyen en la fase de recuperación (Kim *et al.*, 2007). Los autores postularon que este aumento es principalmente atribuible a la infiltración de células inflamatorias y a astrogliosis.

La posibilidad de los inhibidores selectivos de PDE como tratamiento terapéutico ha sido analizada para distintas enfermedades y afecciones del SNC como EM (Dyke and Montana, 2002), depresión y Enfermedad de Alzheimer (Menniti *et al.*, 2006). En concreto la inhibición de PDE4 ha mostrado efectos beneficiosos en el modelo de EAE (Genain *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2005). En linfocitos T de mamíferos predominantemente aparecen PDE3B, 4A, 4B y 7A1 y PDE8A (Giembycz *et al.*, 1996) (Dong *et al.*, 2006) (Tabla 1). Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en PDE4, puesto que representa la principal isoenzima en células T, y sus inhibidores son capaces de disminuir la proliferación de células T CD4⁺, mediada por la inhibición de IL-2 (Bodor *et al.*, 1996), además de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias (Manning *et al.*, 1999). Nuestro grupo ha participado en trabajos en los que se ha determinado que durante el tratamiento de EAE con Rolipram, inhibidor específico de PDE4, disminuye la activación de NF-κB, la expresión de MMP9 y la capacidad de migración en linfocitos T (Sanchez *et al.*, 2005). Pese a los efectos beneficiosos que poseen los inhibidores de PDE4, su principal desventaja son los efectos secundarios que presentan, como náuseas y vómitos. Por ello, existe gran interés en la búsqueda de otras PDE como nuevas dianas terapéuticas.

Una alternativa como diana terapéutica para EAE y EM es la PDE7, puesto que al igual que PDE4 se expresa tanto en linfocitos T como en SNC (Reyes-Irisarri *et al.*, 2005) y tiene el mismo sustrato (AMPc). Existen evidencias de que PDE7A tiene un importante papel en activación de células T (Li *et al.*, 1999; Nakata *et al.*, 2002). Aunque las células T de ratones deficientes en PDE7A son funcionales (Yang *et al.*, 2003), las funciones de PDE7 podrían estar siendo asumidas por PDE7B. La primera familia de compuestos con propiedades inhibitorias para PDE7 fueron derivados de Benzotienotiadiazina (Martinez *et al.*, 2000), aunque espiroquinazolinonas, sulfonamidas, tiadiazoles y análogos de purinas y pirimidinas también han sido descritas como inhibidores de esta PDE (Bernardelli *et al.*, 2004; Lorthiois *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Vergne *et al.*, 2004; Giembycz and Smith, 2006). Ensayos virtuales recientes, han demostrado que derivados de thiadiazina y quinazolina son capaces de inhibir PDE7 (Castro *et al.*, 2008; Castano *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta el momento existen escasísimos inhibidores comerciales para esta PDE (Smith *et al.*, 2004).

La inhibición simultánea de PDE4 y PDE7 aumenta significativamente los efectos producidos por la inhibición de PDE4 en el aumento de AMPc (Smith *et al.*, 2004). Por esto, inhibidores de PDE7 o duales de PDE4/PDE7 podrían representar una nueva clase de inhibidores especialmente útiles en el tratamiento de desórdenes inflamatorios o inmunológicos (Vijayakrishnan *et al.*, 2007).

TABLA 1: Sustrato, distribución tisular e inhibidores específicos de las distintas subfamilias de PDE en mamíferos (Essayan, 2001; Bender and Beavo, 2006; Boswell-Smith *et al.*, 2006).

PDE	Sustrato	Distribución tisular	Distribución SNC (Losformaz)	Inhibidores específicos
PDE1	AMPc, GMPc	Corazón, pulmón, músculo liso y linfocitos	Sí (PDE1A, PDE1B, PDE1C)	Nimodipina, Vinpocetina, IC224, SCH51866 y KS-505a
PDE2	AMPc, GMPc	Glándulas suprarrenales, corazón, pulmón, hígado y plaquetas	Sí (PDE2A)	EHNA, BAY 60-7550 y Pdp IP933
PDE3	AMPc, GMPc	Corazón, pulmón, hígado, plaquetas, tejido adiposo y células inflamatorias	Sí (PDE3B)	Cilostamida, Milrinone, Cilastazol, Enoxamone, Siguzodon y Trequinsin
PDE4	AMPc	Riñón, hígado, pulmón y células inflamatorias	Sí (PDE4A, PDE4B, PDE4D)	Rolipram, Ro 20-1724, Roflumilast y Cilomilast
PDE5	GMPc	Pulmón, riñón, músculo liso vascular y plaquetas	Sí (PDE5A)	Zaprinast, BAPPO, E4021, Sildenafil, Vardenafil y Tadalafil
PDE6	GMPc	Fotorreceptores	Sí (PDE6A-C)	Zaprinast, BAPPO, E4021, Sildenafil y dipiridamole
PDE7	AMPc	Músculo esquelético, corazón, riñón, hígado, páncreas, pulmón y linfocitos T	Sí (PDE7A, PDE7B)	BRL50481 e IC242
PDE8	AMPc	Testículos, ojos, hígado, bazo, músculo esquelético, corazón, riñón, ovario, intestino y linfocitos T	Sí (PDE8B)	Dipiridamole
PDE9	GMPc	Riñón, hígado, bazo y pulmón	Sí (PDE9A)	BAY 73-6691 y Zaprinast
PDE10	AMPc, GMPc	Testículos, corazón y tiroides	Sí (PDE10A)	Papaverina, PQ-10 y Dipiridamole
PDE11	AMPc, GMPc	Músculo esquelético, próstata, riñón, hígado y glándulas salivares, pituitaria y tiroides testículos	No	Tadalafil y Dipiridamole

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo ha sido colaborar en la búsqueda de terapias eficaces para EM. Para ello nos hemos centrado en:

- **IFN β** , tratamiento habitual de EM que no es totalmente eficaz. El conocimiento de los mecanismos por los que ejerce sus efectos beneficiosos ayudaría a potenciarlos o complementarlos con nuevos agentes terapéuticos o con posibles terapias combinadas.
- **Inhibidores de PDE**. Estos agentes poseen importantes propiedades anti-inflamatorias por mecanismos no del todo conocidos. Sin embargo, los inhibidores de los que se dispone en la actualidad poseen importantes efectos secundarios. Sería necesario evitar estos efectos no deseados mediante el diseño de nuevos compuestos, o tratando de combinarlos para disminuir sus dosis.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, los **objetivos específicos** que nos hemos planteado han sido:

1. Estudiar los efectos de IFN β *in vitro* sobre células T durante el proceso de definición de fenotipo T cooperador.
2. Comprobar si los efectos encontrados *in vitro* tienen consecuencias en el tratamiento de EAE, modelo animal de EM.
3. Evaluar los efectos *in vitro* de inhibidores de PDE4, de PDE7 y duales sobre la actividad de linfocitos T utilizando:
 - Los inhibidores ya disponibles comercialmente Rolipram y BRL50481, específicos para PDE4 y PDE7, respectivamente.
 - Nuevos compuestos químicos diseñados y sintetizados para la inhibición de PDE7 o duales para PDE4 y PDE7.
4. Comparar PDE4 y PDE7 como dianas terapéuticas en EAE y evaluar la posibilidad de inhibidores duales.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se detalla la información técnica necesaria para la obtención de materiales o ejecución de métodos específicos del trabajo presentado.

1.- LÍNEAS CELULARES.

DESCRIPCIÓN

El clon de linfocitos T CD4⁺ de fenotipo Th2 D10.G4.1 procede de ratones AKR/J (H-2^k), y es específico para un péptido de conalbúmina de clara de huevo de gallina, en el contexto de antígenos de histocompatibilidad I-A^k (Kaye *et al.*, 1983). Como fuente de IL-2 e IL-4 murinas se utilizaron transfectantes estables de la línea X63Ag8-653 con el plásmido BMGNeomIL4 o con el plásmido BMGNeomIL2, respectivamente, estas líneas fueron cedidas por el Dr. F. Melchers (Karasuyama and Melchers, 1988). Para titular la IL-2 obtenida se utilizó como línea indicadora CTLL-2 (Gillis, 1977), linfocitos T citotóxicos dependientes de IL-2. La IL-4 se ensayó en cultivos de D10.G4.1, de alta respuesta a esta interleuquina. Los hibridomas productores de anticuerpos anti-CD3 (YCD3-1) (Portoles *et al.*, 1989), anti-IL-4 (11B11) (Ohara and Paul, 1988) y anti-IFN- γ (R4-6A.2) (Spitalny and Havell, 1984), fueron cedidos por la Dra. P. Portolés (ISCIH-CSIC).

CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR

Para los hibridomas y células T primarias murinas se utilizó medio Click (Peck and Bach, 1973), suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (FCSi) (por calentamiento a 56°C, 45'), gentamicina (40 μ g/ml) y NaOH 6x10⁻³ N. El clon Th2 (D10.G4.1) (Kaye *et al.*, 1983) fue mantenido en medio Click por presentación antigénica cada 15 días como se indica en (Dorado *et al.*, 1998). Las líneas celulares para la obtención de IL-4 e IL-2 y la línea CTLL-2 se cultivaron en RPMI 1640 (GibcoBRL), con FCSi al 10%, 2 mercaptoetanol 4x10⁻⁵ M y 40 μ g/ml de gentamicina (Sigma, G-1264). Para células CTLL-2 se añadió al medio de cultivo 50 u/ml de IL-2. Las células se mantuvieron en crecimiento exponencial continuo. Todos estos tipos celulares se cultivaron en incubador termostatzado, a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

Estimulaciones específicas:

Para diversos experimentos fue necesario llevar a cabo estimulaciones específicas de las distintas líneas celulares. En todos los casos en los que se utilizó algún reactivo disuelto en medio no acuoso, se complementaron los cultivos control con el mismo

vehículo. A continuación se detallan las condiciones de uso de las drogas y anticuerpos empleados. La referencia de los anticuerpos se indica en el apartado 2 de este capítulo.

- **anti-CD3 (YCD3-1):** fijado a placa por adsorción durante 16 horas a 4°C ó 2h a 37°C, diluido en PBS a una concentración de 10 µg/ml (para células D10.G4.1) ó 50 µg/ml (para células T primarias, LNC y células de bazo total).
- **anti-IL-4 (11B11):** soluble, a 25 µg/ml (inicio diferenciación) o 10 µg/ml (reestímulo a las 72h de diferenciación).
- **anti-IFN-γ (R4-6A.2):** soluble, a 25 µg/ml (inicio diferenciación) o 10 µg/ml (reestímulo a las 72h de diferenciación).
- **Ionomicina:** (Calbiochem, 407952) a una concentración final de 1 µM.
- **PMA:** (Sigma) a una concentración final de 20 ng/ml.
- **IL-4:** obtenido de sobrenadante de células productoras de IL-4 recombinante murina (X63Ag8-653/BMGNeomIL4). A una concentración de 500 u/ml para diferenciación de linfocitos T y 100 u/ml para estímulo de D10.G4.1 en transfecciones.
- **IL-2:** de sobrenadante de células productoras de IL-2 recombinante murina (X63Ag8-653/BMGNeomIL2). A una concentración de 50 u/ml (ensayo de diferenciación).
- **IL-12:** (Peprotech 210-12) recombinante murina purificada, producida en células de ovario de Hamster. A una concentración de 10 ng/ml (ensayo de diferenciación).
- **IL-6:** (eBioscience 14-8061-62) recombinante murina purificada. A una concentración de 20 ng/ml (ensayo de diferenciación).
- **TGF-β:** (Peprotech 100-21C) recombinante humano purificado. A una concentración de 5 ng/ml (ensayo de diferenciación).
- **IL-23:** (eBioscience 14-8239-63) recombinante humana purificada, producida por células de insecto infectadas con baculovirus. A una concentración de 10 ng/ml (ensayo de diferenciación).
- **IFNβ:** recombinante murino purificado (ICN-198767), sintetizado en larvas de gusano de seda. A las concentraciones indicadas para cada experimento.
- **Rolipram:** (Sigma-Aldrich R6520) inhibidor selectivo de fosfodiesterasa 4 (PDE4) específica de AMPc (IC₅₀: 0.55µM) (Castano *et al.*, 2009). Disuelto en DMSO y a

las concentraciones indicadas para cada experimento. Cuando fue combinado con otros inhibidores cada uno se empleó a la mitad de la concentración.

- **BRL50481:** (Tocris Bioscience 2237) inhibidor selectivo de fosfodiesterasa 7 (PDE7) específica de AMPc (IC₅₀: 0,26 µM) (Smith *et al.*, 2004). Disuelto en DMSO y a las concentraciones indicadas para cada experimento. Cuando fue combinado con Rolipram cada uno se empleó a la mitad de la concentración.

Para los inhibidores de PDE de nueva síntesis caracterizados en este trabajo (Tabla 5 de resultados) las condiciones de tratamiento utilizadas se especifican al detallar los experimentos correspondientes. Estos inhibidores también fueron disueltos en DMSO.

2.- ANTICUERPOS.

Los anticuerpos señalados con asterisco fueron obtenidos de hibridomas según el método detallado más abajo.

- **Anti-CD3ε:** YCD3-1^(*), monoclonal de rata, isotipo IgG2b, (Portoles *et al.*, 1989). Se utilizó para estimulación celular a través del TCR.
- **Anti-CD4:** GK1.5-FITC (Miltenyi Biotec, 130-091-608), monoclonal, isotipo IgG2b, marcado con el fluoróforo FITC. Para purificación de células CD4⁺.
- **Anti-CD8:** 53-6.7-FITC (Miltenyi Biotec, 130-091-605), monoclonal, isotipo IgG2a, marcado con el fluoróforo FITC. Para purificación de células CD8⁺.
- **Anti-CD25:**
 - 7D4, monoclonal de ratón, isotipo IgM, reconoce la cadena α del receptor de alta afinidad de IL-2 (CD25), marcado con el fluoróforo PE (Miltenyi 130-091-013) ó APC (Miltenyi 130-093-734), ambos para tinción en superficie.
 - PC61, (BD Pharmingen, 561112) isotipo IgG1, reconoce CD25, marcado con PE-Cy7. Para tinción en superficie.
- **Anti-FITC-Microbeads** (Miltenyi Biotec, 130-048-701), monoclonal de ratón, isotipo IgG1, reconoce fluoróforo FITC sobre microbola magnética.
- **Anti-IL-4, para ensayos de ELISA:**
 - 11B11^(*), monoclonal de rata, isotipo IgG1 (Ohara and Paul, 1988).
 - BVD6-24G2-Biotinilado (BD Pharmingen, 554390), monoclonal de rata, isotipo IgG1 (Abrams *et al.*, 1992).
- **Anti-IFNγ, para ensayos de ELISA:**

- R4-6A.2^(*), monoclonal de rata, isotipo IgG1, (Spitalny and Havell, 1984).
- XMG 1.2-Biotinilado (BD Pharmingen, 554410), monoclonal de rata, isotipo IgG1 (Spitalny and Havell, 1984).
- **Anti-IL-10, para ensayos de ELISA:**
 - Jes5-2A5 (BD Pharmingen, 551215), monoclonal de rata, isotipo IgG1.
 - Jes5-16E3 Biotinilado (BD Pharmingen, 554465), monoclonal de rata, isotipo IgG2b.
- **Anti-IL-17:**
 - TC11-18H10 marcado con el fluoróforo PE (BD Pharmingen, 559502), monoclonal de rata, isotipo IgG1. Para tinción intracelular.
 - Ebio17CK15A (eBioscience 16-7175), isotipo IgG2a. Para ensayos de ELISA.
 - Ebio17B7 biotinilado (eBioscience 13-7177), isotipo IgG2a. Para ensayos de ELISA.
- **Anti-Foxp3:** FJK-16s marcado con el fluoróforo PE (eBiosciences 72-5775-40), monoclonal de rata, isotipo IgG2a. Para tinción intracelular.

Para la obtención de los anticuerpos monoclonales purificados en nuestro laboratorio, los hibridomas se expandieron hasta el máximo crecimiento en medio Click a 37°C y se mantuvieron en cultivo hasta el 90% de muerte celular. El sobrenadante se filtró (0,22 µm) y las inmunoglobulinas se precipitaron con sulfato amónico a saturación con agitación continua durante 1 hora. Se centrifugó y el sedimento obtenido se resuspendió en sulfato amónico al 45% centrifugando de nuevo. El sedimento final, fue resuspendido en un volumen mínimo de agua destilada. Después de dializar frente a PBS, se centrifugó durante 20 min a 2500 rpm y se filtró (0,22 µm). Los anticuerpos monoclonales fueron purificados por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A o de proteína G acoplada a sefarosa (Hi-Trap, Pharmacia), según el isotipo del anticuerpo.

3.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se emplearon ratones C3H (H-2^k) de 3 meses de edad para la obtención de *feeders*, para aislamiento de células T CD4⁺ totales para ensayos de polarización de fenotipos T1/T2/T17, y para la obtención células T CD4⁺CD25⁻ y T CD4⁺CD25⁺ para

los ensayos de supresión. Para la inducción de EAE, se utilizaron ratones hembra de la cepa SJL (H-2^s), de ocho a doce semanas, obtenidos de la casa Charles-River.

4.- OLIGONUCLEÓTIDOS.

En la Tabla 2, se representan las secuencias 5'-3' de los cebadores en las reacciones de PCR en tiempo real descritas en el apartado 15 de Materiales y Métodos.

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para PCR.

Nombre	Secuencia 5'- 3'	Secuencia que amplifican
IL-4 (dir)	ATCCTGCTCTTCTTCTCG	Posición +92 (dir) a +467 (rev) del gen de IL-4 murino (375n) (Otsuka <i>et al.</i> , 1987).
IL-4 (rev)	GATGCTCTTTAGGCTTCC	
IL-10 (dir)	TGCTATGCTGCCTGCTCTTA	Posición +92 (dir) a +497 (rev) del gen de IL-10 murino (405n) (Fiorentino <i>et al.</i> , 1989).
IL-10 (rev)	GCTCCACTGCCTTGCTCTTA	
IFN- γ (dir)	TGCATCTTGCTTTGCAGCTCTTCTCATGGC	Posición +125 (dir) a +490 (rev) del gen de IFN- γ murino (365n) (Gray and Goeddel, 1983).
IFN- γ (rev)	TGGACCTGTGGGTTGTTGACCTCAAACCTTGGC	
β -actina (dir)	TGTTACCAACTGGGACGACA	Posición +305 (dir) a +450 (rev) del gen de β -actina de ratón (145n) (Tokunaga <i>et al.</i> , 1986).
β -actina (rev)	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	
Foxp3 (dir)	ACCACCTTCTGCTGCCACTG	Posición +450 (dir) a +599 (rev) del cDNA del gen Foxp3 murino (149n) (Brunkow <i>et al.</i> , 2001).
Foxp3 (rev)	TGCTGTCTTCTCTGGGTGTACC	
IL-17 (dir)	GAAGCTCAGTGCCGCCA	Posición +337 (dir) a +399 (rev) del gen de la IL-17 murina (62n) (Hofstetter <i>et al.</i> , 2005).
IL-17 (rev)	TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT	
Bcl-xL (dir)	ACAGCAGCAGTTTGATGC	Posición +212 (dir) a +505 (rev) del gen de la IL-17 murina (293n) (Martin-Saavedra <i>et al.</i> , 2008)
Bcl-xL (rev)	AACTTGCAATCCGACTCACC	

5.- PLÁSMIDOS.

PLÁSMIDOS PORTADORES DEL GEN INDICADOR LUCIFERASA (LUC).-

En la Tabla 3 se muestran los plásmidos utilizados para los estudios de actividad transcripcional en células D10.G4.1. La actividad transcripcional es detectada por un aumento en la actividad luciferasa, en vectores con el gen de la luciferasa controlado por elementos de respuesta a los factores de transcripción CREB, NFAT, NFkB o Stat6. En la columna central se indica la secuencia que controla la expresión del gen Luc (que codifica el enzima luciferasa de *Photinus pyralis*) en cada plásmido.

PLÁSMIDO PARA EL CONTROL DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN.-

En cada transfección, junto al plásmido portador del gen Luc, se cotransfectó el plásmido pRL-TK (Promega), portador del gen RLuc (luciferasa de *Renilla reniformis*)

bajo el control del promotor de timidina quinasa del virus del herpes simplex (TK-HSV). Las diferencias de actividad transcripcional del gen Luc debidas a distintas eficiencias de transfección entre las distintas muestras se normalizó a la actividad enzimática generada por pRL-TK.

Tabla 3: Plásmidos Luc para ensayos de actividad transcripcional.

Plásmido	Secuencia que controla la expresión del gen Luc	Referencia
PGL4.24[luc2P / minP] vector	Promotor mínimo (minP)	Promega, E-8421
PGL4.29[luc2P/CRE / Hygro] vector	Elemento de respuesta a AMPc unido al promotor de SV40	Promega, E-8471
PGL4.30[luc2P /NFAT-RE/ Hygro] vector	Elemento de respuesta a NFAT (NFAT-RE) unido al promotor de SV40	Promega, E-8481
P1-mutNFAT	Dímero del sitio P1 donde se ha eliminado el sitio NFAT, insertado en XhoI de pGL3promoter con el promotor de SV40	(Dorado <i>et al.</i> , 2002)
pGL2prom	Promotor temprano de SV40	Promega, E-1631
pGL3prom	Promotor temprano de SV40	Promega, E-1761
κB-pGL3-prom	Hexámero del sitio κB de MMP-9 insertado en XhoI de pGL3promoter con el promotor de SV40	(Sanchez <i>et al.</i> , 2005)

6.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL.

Los ensayos de actividad transcripcional se realizaron en células de la línea D10.G4.1 por transfecciones transitorias mediante electroporación. Se utilizaron 10^7 células, resuspendidas en 400 µl de medio de cultivo, que fueron incorporadas a una cubeta de electroporación con una distancia entre electrodos de 0.4 cm (BioRad-1652088). Para cada transfección se utilizaron 5µg del plásmido *reporter* indicado en la leyenda de las figuras correspondientes y en todos los casos se cotransfectaron 3µg de pRL-TK para normalizar los resultados respecto a la eficiencia de transfección. Las células se sometieron a un pulso de 270 V (975 µF) y se dejaron a 1×10^6 cel/ml en medio completo. Se mantuvieron en cultivo durante 4 (análisis de CREB) ó 24 horas (resto de los factores analizados NFAT, NFκB y STAT6), en presencia de estimulación específica (anti-CD3 para CREB, Ionomicina+PMA para NFAT y NFκB, e IL-4 para Stat6) y en presencia o ausencia de inhibidores de PDE. La actividad luciferasa se determinó mediante luminómetro de tubo (Berthold Detection Systems, SIRIUS 0; ó MGM Instruments, Optocomp I). Cada muestra fue ensayada por triplicado.

7.- PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T.

Las células T fueron obtenidas de bazos de ratones C3H (Martin-Saavedra *et al.*, 2008). La purificación de los distintos tipos celulares se llevó a cabo bien por selección

positiva o por selección negativa, utilizando materiales suministrados por Miltenyi biotec, y siguiendo los procedimientos aconsejados por esta casa comercial.

Para purificación por selección positiva de células $CD4^+$ o $CD8^+$ se utilizaron respectivamente anti- $CD4$ -FITC (Miltenyi biotec, 130-091-608) o anti- $CD8$ -FITC (Miltenyi biotec, 130-091-605) como anticuerpos primarios. En ambos casos se recuperaron las células marcadas mediante unión a anti-FITC-Microbead (Miltenyi biotec, 130-048-701). Para la purificación de células $CD4^+$ por selección negativa se utilizó el Kit de Miltenyi biotec nº 130-090-860. En ambos casos la eficiencia de purificación comprobada por citometría de flujo osciló entre 85% y 95%.

Para la purificación de células T $CD4^+CD25^+$ se utilizó el $CD4^+CD25^+$ Regulatory T Cell Isolation Kit de la misma casa comercial. Una vez obtenidas las células, se realizó una segunda purificación marcando las células con el anticuerpo $CD4^+$ -FITC para obtener una población más pura en $CD4^+CD25^+$. La población obtenida presentó una proporción de 80-85% de células $CD4^+CD25^+$.

Para los casos en que se requirió una mayor pureza de las fracciones celulares $CD4^+CD25^+$ y $CD4^+CD25^-$, se utilizó purificación por citometría de flujo (cell sorting). Para ello, se descartaron previamente las células no viables por tinción con yoduro de propidio. Las células T fueron purificadas en un FACS Vantage SE (Becton-Dickinson) y se recogieron ambas fracciones obteniéndose una pureza del 97-99%

8.- DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LINFOCITOS T.

Se utilizaron poblaciones de células $CD4^+$ (para fenotipos Th) o $CD8^+$ (para fenotipos Tc) obtenidas magnéticamente como se indica en el apartado anterior. Estas poblaciones se estimularon con anti- $CD3$ inmovilizado en placa en presencia de diferentes citoquinas para dirigir hacia cada uno de los 3 fenotipos:

- Para T1: IL-12 (Prepotech, 210-12) a 10ng/ml y anti-IL4 (11B11, 25 μ g/ml) para bloquear IL-4 y dificultar diferenciación a T2.
- Para T2: IL-4 a 500 u/ml y anti-IFN γ (R4-6A2, 25 μ g/ml), para bloquear IFN- γ y dificultar diferenciación a T1.
- Para T17: IL-6 (eBioscience 14-80-61) a 20 ng/ml y TGF- β (Peprotech 100-21C) a 5 ng/ml, además de 25 μ g/ml de anti-IL4 (11B11) y anti-IFN- γ (R4-6A2 a 25 μ g/ml), para bloquear respectivamente IL-4 e IFN- γ producidos en cultivo.

En los tres casos se siguió el protocolo de diferenciación como se indica en (Martin-Saavedra *et al.*, 2008). Cuando la estimulación con anti-CD3 se realizó en ausencia de presión selectiva de citoquina diferenciadora-anticuerpo bloqueante, las poblaciones resultantes fueron denominadas T0 (Th0 y Tc0). Estas poblaciones son una mezcla heterogénea de células productoras de citoquinas de diferentes subtipos. Parte de los experimentos de definición de fenotipo fueron realizados añadiendo IFN β o inhibidores de PDE4 y PDE7 ó duales. Las concentraciones utilizadas, de cada uno de ellos, se indican en las leyendas de cada figura correspondiente.

9.- PROLIFERACIÓN CELULAR.

MEDIANTE TINCIÓN CON CFSE.- Para la tinción con CFSE, los linfocitos CD4⁺ *naïve* aislados magnéticamente, fueron incubados y teñidos con CFSE realizando el protocolo descrito en (Martin-Saavedra *et al.*, 2008). Posteriormente se resuspendieron en medio completo Click a $0,5 \times 10^6$ células/ml y se estimularon las células con anti-CD3 fijado a placa sólo o en presencia de IFN β durante 48h. La fluorescencia fue analizada por citometría de flujo (FACSCanto, Becton Dickinson) para determinar el número de divisiones celulares producidas en los cultivos.

MEDIANTE ENSAYO COLORIMÉTRICO DE MTT.- Se siguió el método descrito por (Mosmann, 1983). Cada muestra fue ensayada por cuadruplicado. El número de células fue de 1×10^4 para el clon D10.G4.1, o 2×10^5 células T primarias en 200 μ l en placa multipocillo. El tiempo de incubación fue de 72 horas. Cuando se quiso cuantificar la producción de interleuquinas, antes de añadir el MTT a los cultivos, se retiraron 100 μ l de sobrenadante para utilizar en ensayo de ELISA.

Para los ensayos de supresión de células T efectoras por células supresoras se llevaron a cabo cocultivos de células CD4⁺CD25⁻ (respondedoras) y CD4⁺CD25⁺ (Treg supresoras), o bien células CD4⁺ totales pre-prestimuladas 72 h con anti-CD3 fijado a placa en presencia o ausencia de IFN β (2500 u/ml) para analizar su posible actividad supresora. Estos cocultivos fueron estimulados con anti-CD3 soluble (20 μ g/ml) y células presentadoras de antígeno. Como fuente de células presentadoras se utilizaron células totales de bazo de ratones C3H (1×10^6 cells/ml) previamente tratadas con Mitomicina C (MMC). Por otra parte, se determinó la proliferación de células T CD4⁺ *naïve*, parcial (2/3) o totalmente deplecionadas de células CD25⁺, estimuladas con anti-

CD3 fijado a placa en presencia o ausencia de IFN β (2500 u/ml). La proliferación de las células respondedoras fue cuantificada por el método colorimétrico de MTT.

10.- CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUQUINAS MEDIANTE ELISA.

Sobrenadantes de los cultivos empleados para proliferación por el método colorimétrico de (MTT), fueron utilizados para cuantificar la producción de citoquinas IL-4, IFN- γ , IL-10 e IL-17 utilizando los anticuerpos de captura 11B11 (5 μ g/ml), R4-6A.2 (5 μ g/ml), Jes5-2A5 (10 μ g/ml) y eBio17CK15A5 (2 μ g/ml) respectivamente. Como anticuerpo de detección se utilizaron formas biotiniladas de los anticuerpos BVD6-24G2 (0,5 μ g/ml) para IL-4; XMG 1.2 (0,5 μ g/ml), para IFN- γ ; Jes5-16E3 (2,5 μ g/ml) para IL-10; y EBio17B7 (1 μ g/ml) para IL-17. Para la incubación de cada anticuerpo se siguieron las instrucciones de los suministradores. El método de detección fue el descrito en (Martin-Saavedra *et al.*, 2007).

11.- CUANTIFICACIÓN DE AMPc INTRACELULAR.

Los niveles de AMPc intracelular producidos por la inhibición de PDEs fueron determinados mediante enzimoimmunoensayo competitivo utilizando el kit comercial de Amersham (cAMP Direct Biotrak EIA; RPN 2255). El procedimiento indicado fue el empleado en (Castano *et al.*, 2009).

12.- ANÁLISIS DE APOPTOSIS, CICLO Y TOXICIDAD CELULAR.

El nivel de apoptosis espontánea en los cultivos celulares, fue determinado mediante citometría de flujo (FACSCanto, Becton Dickinson) siguiendo el protocolo de tinción con Anexina-V indicado en (Martin-Saavedra *et al.*, 2008). Para determinar la apoptosis derivada de la activación por TCR, previo a la tinción con Anexina-V se sometió a los cultivos celulares a una ronda de activación durante 48h con anti-CD3 en presencia de Rolipram (10 μ M) o de la cantidad de DMSO equivalente en los cultivos control. Para los ensayos de ciclo celular se determinó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular por citometría de flujo siguiendo las indicaciones incluidas en (Martin-Saavedra *et al.*, 2008). Los análisis de viabilidad celular también se realizaron por citometría de flujo tras incorporación de Ioduro de Propidio siguiendo el protocolo previamente publicado (Castano *et al.*, 2009).

13.- EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE E INTRACELULARES.

Para analizar la expresión de moléculas de superficie celular se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para dichas moléculas marcados con fluorocromo FITC, PE, PE-Cy7 o APC (apartado 2 de Materiales y Métodos). El análisis se realizó en los citómetros de flujo FACSCalibur y FACSCanto (Becton Dickinson). Para tinción de proteínas en superficie y tinción intracelular de Foxp3 se siguió el protocolo empleado en (Martin-Saavedra *et al.*, 2008). Para tinción intracelular de IL-17, los cultivos fueron estimulados con Ionomicina+PMA durante 5 horas a una concentración de 1×10^6 células/m. A cada cultivo se añadió Brefeldina (Kit GolgiPlug, BD Bioscience 555028) y Monensina (Kit GolgiStop, BD Bioscience 554715) en las cantidades indicadas en el protocolo de cada kit. Después las células fueron permeabilizadas y fijadas con el buffer Fix-Perm y teñidas con anti-IL-17-PE (BD Bioscience 559502) siguiendo el protocolo indicado para el Kit (BD Cytofix/Cytoperm, BD Bioscience 554714). En todos los casos, antes de la tinción con el anticuerpo en ensayo se añadió a las muestras BDFc Block (BD Pharmingen, 553142) para eliminar uniones inespecíficas a receptores Fc.

14.- OBTENCIÓN DE RNA TOTAL.

Para la extracción de RNA de células obtenidas de órganos se utilizó el sistema RNA-easy (Quiagen, 74104), como se indica en (Martin-Saavedra *et al.*, 2007). Para la obtención de RNA de órganos completos se utilizó el sistema comercial de extracción Trizol Reagent (Invitrogen, 15596-018) acoplado al sistema de columnas de extracción de RNA-easy (Quiagen, 74104), eliminando el DNA cromosómico mediante DNaseI libre de RNase proporcionada por la misma casa comercial (Quiagen, 79254). La concentración de mRNA obtenido fue determinada mediante espectrofotometría (absorbancia 260 nm), comprobándose la integridad de los RNA ribosomales por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

15.- CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE RNA MENSAJERO.

RETROTRANSCRIPCIÓN IN VITRO.- A partir de los RNAs mensajeros de las muestras, se realizaron reacciones de retrotranscripción (RT) con poly-dT y AMV-RT (Promega M5101) para dar lugar a los cDNAs correspondientes (Martin-Saavedra *et al.*, 2007).

PCR EN TIEMPO REAL.- Las parejas de oligonucleótidos utilizados para la realización de RT-PCR en tiempo real son los descritos en la Tabla 2. Para la realización de RT-PCRs se empleó el kit comercial *Lightcycler FastStart DNA Master SYBR GreenI* de Roche siguiendo las instrucciones de uso para 20 µl de volumen final. Todos los ensayos fueron realizados en el termociclador *Lightcycler* de Roche en las condiciones de reacción indicadas en la Tabla 4. La concentración de cebadores para todos los casos fue de 0.3 µM y la temperatura de lectura de fluorescencia de 72°C.

Tabla 4: Condiciones de reacción para PCR en tiempo real.

GEN	IL-4	IL-10	IFN-γ	IL-17	Foxp3	Bcl-xL	β-actina
T° ANILLAMIENTO	61° C	60° C	64° C	62° C	60° C	60° C	60° C
TIEMPO DE ELONGACIÓN	15''	17''	15''	4''	7''	12''	22''
CONCENTRACIÓN DE MgCl ₂	3 mM	2 mM	2 mM	3 mM	3 mM	3.5 mM	2 mM

ANÁLISIS MATEMÁTICO DE RESULTADOS.- A través del software LightCycler 4.0 (Roche), se analizó la fluorescencia emitida por la sonda *SYBGreenI* durante las reacciones de PCR en tiempo real descritas en el apartado anterior, y se obtuvieron los valores de *crossing point* (CP) para cada gen *target* y el gen de referencia (el gen *house keeping* β-actina) en cada una de las muestras. En cada reacción de PCR en tiempo real se incluyó una curva de calibración, y a partir de su pendiente (pdte) se calculó el valor de eficiencia de reacción para el gen *target* (E_{target}) y el gen de referencia ($E_{referencia}$). En la figura 6 se muestran curvas para cada gen analizado y las eficiencias de reacción obtenidas a partir de ellas.

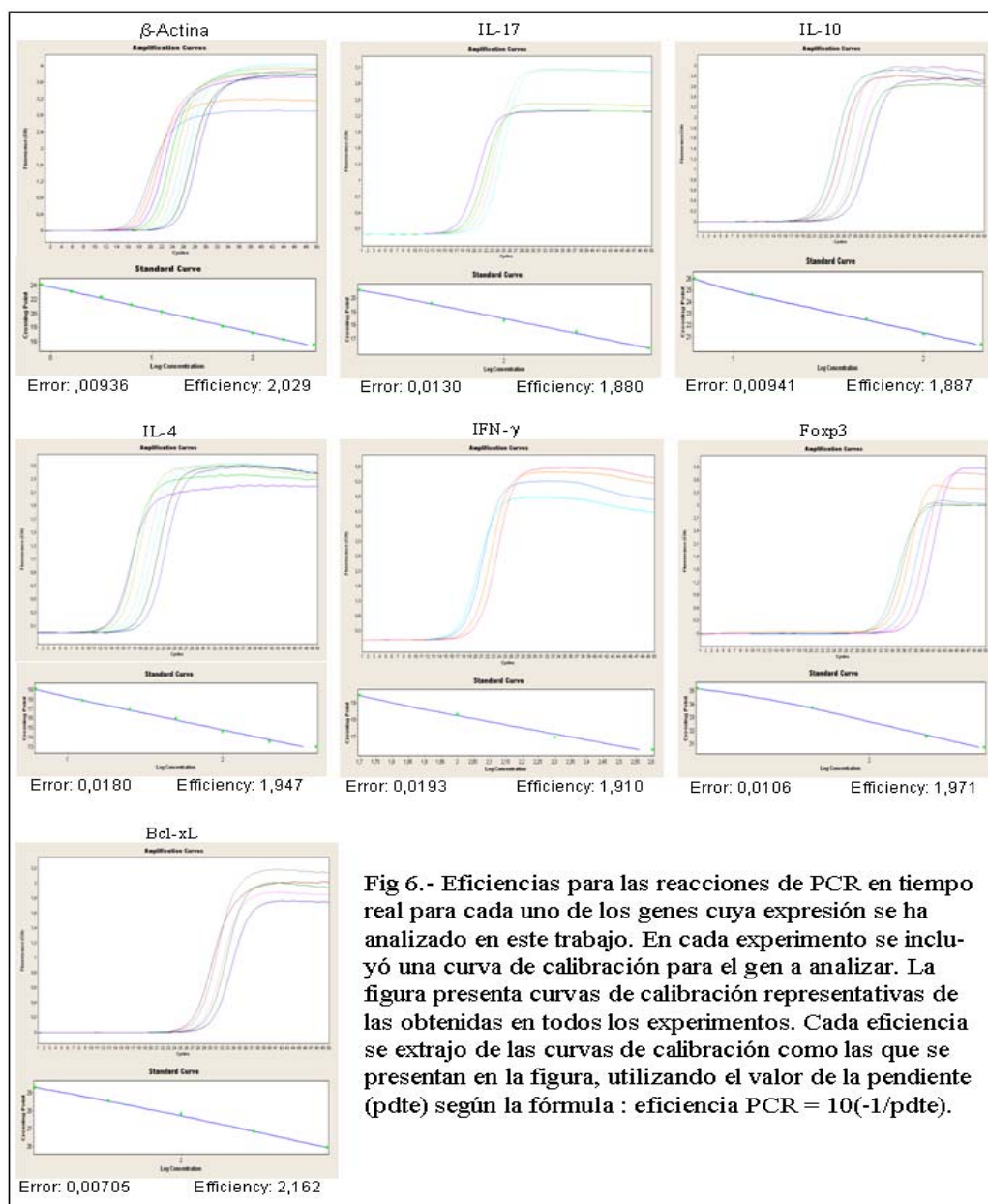
Utilizando la ecuación propuesta por (Pfaffl, 2001) se relativizaron los valores de CP de los genes *target* y referencia en la muestra problema, a los valores de CP obtenidos para estos genes en el punto de la curva de calibración utilizado como control, con una cantidad de cDNA total equivalente al presentado por la muestra problema. De este modo se obtuvo el ratio de expresión relativa del gen *target* con respecto al gen de referencia entre las muestras control y problema.

Método de PFFAFL -

$$ratio \text{ de expresión relativa} = \frac{E_{target}^{(Cp \text{ control} - Cp \text{ problema})}}{E_{referencia}^{(Cp \text{ control} - Cp \text{ problema})}}$$

16.- INDUCCIÓN ACTIVA DE EAE Y TRATAMIENTOS.

En los ensayos de inducción activa de EAE se utilizaron ratones SJL hembras de 8 a 12 semanas, sexo y edad en el que la susceptibilidad a la enfermedad es más acusada (Jansson *et al.*, 1995). La inducción activa de EAE fue realizada mediante inmunización subcutánea con MBP como ha sido descrito previamente en (Martin-Saavedra *et al.*, 2007). Para la evaluación de los síntomas clínicos todos los animales inoculados se examinaron diariamente utilizando la siguiente escala: 0, sin signos clínicos; 1, pérdida del tono de la cola; 2, pérdida de la fuerza de la cola; 3, paresia de las patas traseras; 4, paraplejia; 5, tetraplejia.



Para el tratamiento con IFN β (ICN, cat n° 198767) se administraron por vía intraperitoneal 1.000 unidades por ratón cada tres días desde el día 0 hasta el final del estudio. Para los tratamientos con Rolipram (Sigma-Aldrich R6520) o BRL50481 (Tocris, Bioscience 2237) los animales fueron inyectados a diario intraperitonealmente (100 μ l por ratón). Para su disolución estos compuestos fueron sonicados en PBS durante aproximadamente 5h.

17.- OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LNC, BAZOS Y SNC.

Los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂ y perfundidos a través del ventrículo izquierdo del corazón con PBS. Posteriormente, se obtuvieron los bazo y ganglios (de las regiones inguinal y axilar). Después de disgregar los órganos individuales, se establecieron “pooles” de las muestras para cada grupo de animales y se procesaron como se indica en (Martin-Saavedra *et al.*, 2008).

La extracción de médulas fue realizada por extrusión mediante inyección de PBS en la cavidad medular, de donde se obtuvieron las médulas enteras. Por una parte se siguió el protocolo indicado en (Martin-Saavedra *et al.*, 2008) utilizando un gradiente de Percoll para separación de células mononucleares de infiltrados o sin purificación por gradiente de percoll para la utilización de células totales de médula después de su digestión por colagenasa. Por otra parte, en los experimentos de EAE de animales tratados con los inhibidores de PDEs, las médulas fueron congeladas para su posterior extracción de RNA.

18.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En todos los experimentos que lo han requerido, los resultados numéricos se exportaron al programa GraphPad Prism 5 donde se llevó a cabo el análisis estadístico. Se han hallado las medias aritméticas de los valores obtenidos para cada tratamiento y los valores de error estándar de la media. El estudio de diferencias significativas se realizó mediante el uso del test-t no pareado con las correcciones de Welch. El nivel de significación estadística considerado en este trabajo ha sido como mínimo de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1.- EFFECTO DE IFN β SOBRE LINFOCITOS T.

El mecanismo de acción por el que IFN β ejerce sus efectos beneficiosos en EM, no es completamente conocido. Resultados previos de nuestro grupo habían mostrado que dicho tratamiento en el modelo animal de EAE-MBP, da lugar a una reducción de los infiltrados perivasculares y a una disminución y retraso de los síntomas clínicos de la enfermedad (Fig. 5 de introducción) (Martin-Saavedra *et al.*, 2007). Dada la fuerte implicación que tienen las células T en el desarrollo de la enfermedad y en la formación de infiltrados en SNC, nos propusimos llevar a cabo ensayos *in vitro*, para determinar el efecto que ejerce IFN β sobre este tipo celular.

1.1.- TRATAMIENTO *IN VITRO* DE CÉLULAS T CON IFN β .

1.1.1.- Capacidad proliferativa de linfocitos T tratados con IFN β .

Se conoce desde hace años que IFN β ejerce un efecto antiproliferativo sobre linfocitos T (Stark *et al.*, 1998; Taki, 2002). Sin embargo, hasta el momento, no se había descrito si dicha inhibición tiene lugar sobre los dos subtipos de células T maduras, CD4⁺ y CD8⁺. Nos planteamos analizar el efecto de IFN β sobre cada uno de estos tipos celulares de manera independiente. Para ello se utilizaron células de bazo de ratones C3H, a partir de las que se purificaron individualmente poblaciones *naïve* CD4⁺ y CD8⁺ y se cultivaron en presencia de IL-2 y anti-CD3 fijado a placa durante siete días (condiciones T0, ver sección 8 de materiales y métodos). Para cada tipo celular se utilizaron tres condiciones de cultivo (1.000 u/ml o 2.500 u/ml de IFN β , o cultivos control sin el fármaco). Las poblaciones resultantes fueron sometidas a una segunda ronda de activación con anti-CD3 manteniendo las mismas concentraciones de IFN β que en los cultivos primarios. Después de 72 horas se analizó la proliferación de dichos cultivos mediante ensayo colorimétrico.

Los resultados observados en la figura 7A, muestran que el nivel de proliferación en células CD8⁺ no se ve afectado por IFN β , mientras que existe una clara disminución de la proliferación de manera dosis dependiente en los linfocitos CD4⁺ tratados con el fármaco. Este efecto antiproliferativo de IFN β sobre linfocitos CD4⁺ se observó también durante la primera ronda de estimulación por anti-CD3, ya que mediante tinción con CFSE y análisis por citometría de flujo, se vio que en los cultivos tratados con IFN β el número de divisiones celulares disminuía de 3 a 2 en 48 horas (Fig 7B).

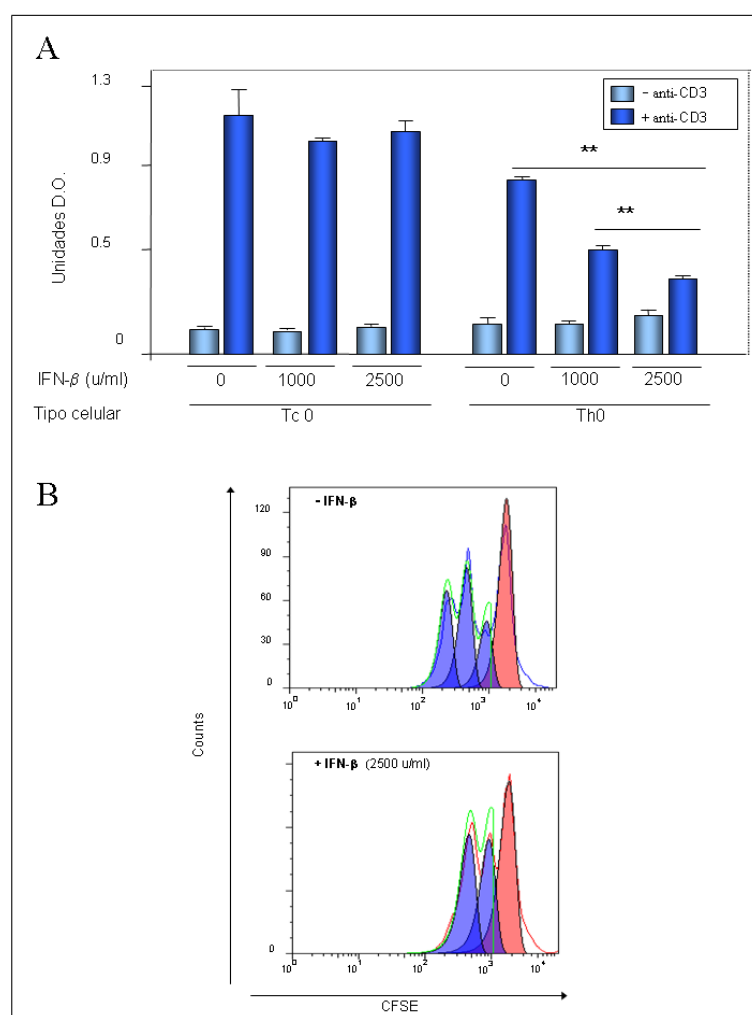


Figura 7. Efecto de IFN β sobre la capacidad proliferativa de células T CD8 $^{+}$ (Tc) y CD4 $^{+}$ (Th). (A) Células CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ fueron aisladas y expuestas a condición de polarización hacia T0 en presencia de las dosis indicadas de IFN β . Después de 7 días de cultivo, ambas poblaciones fueron estimuladas en la segunda ronda de activación durante 72h con anti-CD3 fijado a placa manteniendo las mismas dosis de IFN β en cada caso. La proliferación de las muestras fue determinada por ensayo colorimétrico con MTT. Los valores obtenidos son las medias de tres experimentos independientes en los que cada muestra fue ensayada por triplicado. $^{**}(p < 0.01)$. (B) Células CD4 $^{+}$ naïve fueron teñidas con CFSE y activadas con anti-CD3 fijado a placa sólo o en presencia de IFN β , 48h después fue analizada su fluorescencia por citometría de flujo para determinar el número de divisiones celulares.

A la vista de los resultados obtenidos sobre la capacidad proliferativa de las células CD4 $^{+}$, quisimos determinar si IFN β podría estar afectando al ciclo celular y ésto a su vez se viese reflejado en una disminución de la proliferación. Para ello, realizamos ensayos de ciclo celular con Ioduro de Propidio. Sin embargo, la disminución de la proliferación no está mediada por una parada del ciclo, ya que, como se puede apreciar en la figura 8A, no existen diferencias significativas entre el cultivo tratado y sin tratar con IFN β en

cuanto a la proporción de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular.

Otra de las razones para la inhibición de proliferación celular, podría ser una disminución del marcador de activación y supervivencia de células T, CD25, que constituye la cadena α del receptor de alta afinidad de IL-2, denominada IL-2R α . Sin embargo, sorprendentemente, los ensayos realizados por citometría de flujo con anti-CD25-PE, mostraron una mayor expresión de este receptor a D7 en las células tratadas con IFN β como puede observarse en la figura 8Bi. Para saber en qué fase del proceso de activación a través del TCR se produce esta diferencia entre células tratadas y sin tratar con IFN β , cuantificamos la presencia de CD25 en membrana en diferentes momentos desde el inicio de la estimulación celular. La sobreexpresión inicial de CD25 promovida por la activación con anti-CD3, no es modificada notablemente por el tratamiento con IFN β . Sin embargo, en etapas tardías (D6-D7), mientras los niveles de CD25 disminuyen progresivamente en el cultivo control, las células tratadas con IFN β conservan unos altos niveles de este marcador en superficie (Fig. 8Bii). Por el momento no podemos explicar este efecto de IFN β ; sin embargo, independientemente de sus causas, los resultados indican que la disminución de proliferación no está mediada por una disminución de la cadena α del receptor de IL-2.

Por otra parte, comprobamos que la disminución de respuesta proliferativa de las células CD4⁺ activadas en presencia de IFN β es un efecto que permanece en la población resultante del tratamiento, aún cuando IFN β desaparezca del medio de cultivo. Esta conclusión pudo ser extraída del resultado de la figura 9, donde se analiza la proliferación en cultivos en los que IFN β ha sido eliminado durante la segunda ronda de activación con anti-CD3. A pesar de ello, la proliferación en respuesta a estímulo del TCR fue superior en los cultivos control que en aquellos que habían sido tratados con IFN β durante la estimulación primaria. Este resultado indica que IFN β confiere alguna característica a las poblaciones tratadas, que reprime la respuesta a anti-CD3, y que es independiente de la presencia continuada de esta citoquina.

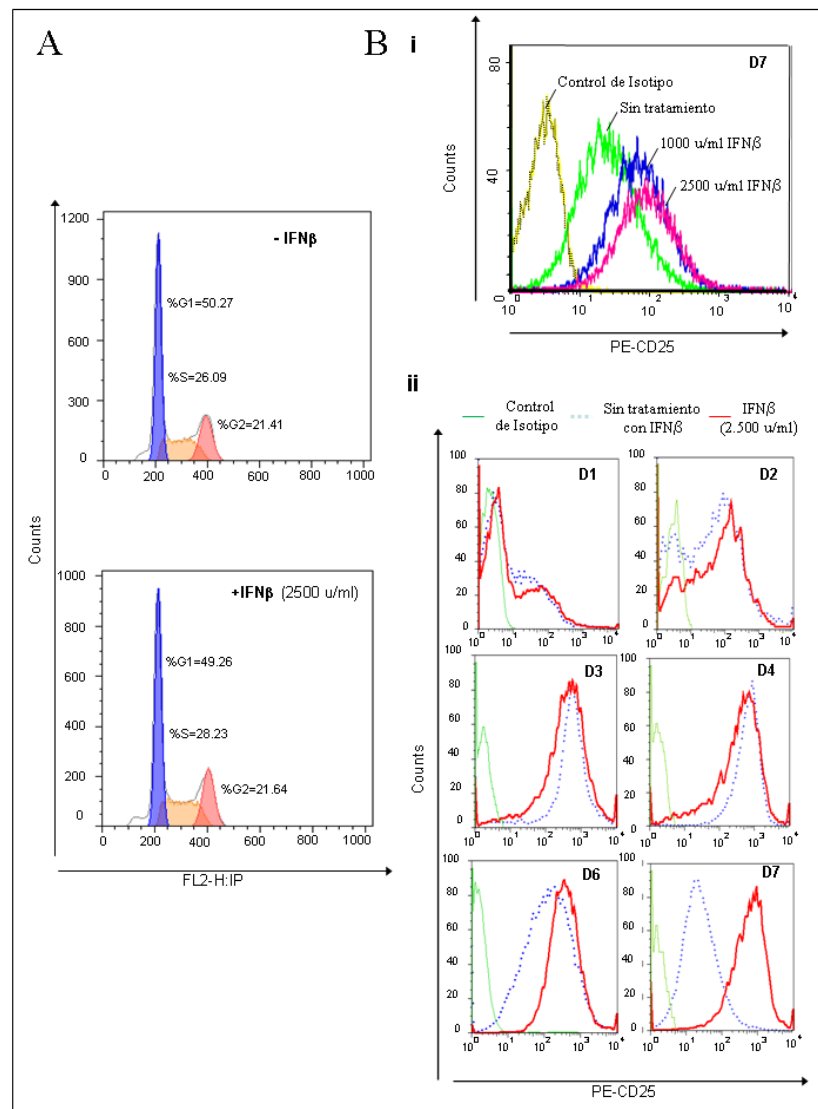


Figura 8. Efecto del IFN β sobre el ciclo celular y en la expresión de CD25. (A) Células CD4⁺ *naïve* fueron estimuladas con anti-CD3 fijado a placa en presencia o ausencia de IFN β . Después de 72h, las células fueron incubadas con RNAsa libre de DNAsa e IP. La fluorescencia fue medida por citometría de flujo para determinar la distribución del ciclo celular. El porcentaje de células que se encuentran en fase G1, S o G2 del ciclo, se indica en la figura. (B) Células CD4⁺ *naïve* fueron dirigidas hacia la condición T0, en presencia de la concentración indicada de IFN β durante 7 días. La expresión de CD25 fue cuantificada por citometría de flujo después de tñir las muestras con anti-CD25-PE. El sub-panel Bi muestra el resultado después del periodo completo de tratamiento (D7). El sub-panel Bii muestra los cambios en los niveles de CD25 a lo largo de sucesivas fases del proceso de polarización en las muestras tratadas con 2.500 U/ml de IFN β o sin tratamiento. Los días de análisis se muestran en los diferentes histogramas como D1–D7. Aquí se presenta uno de tres experimentos independientes.

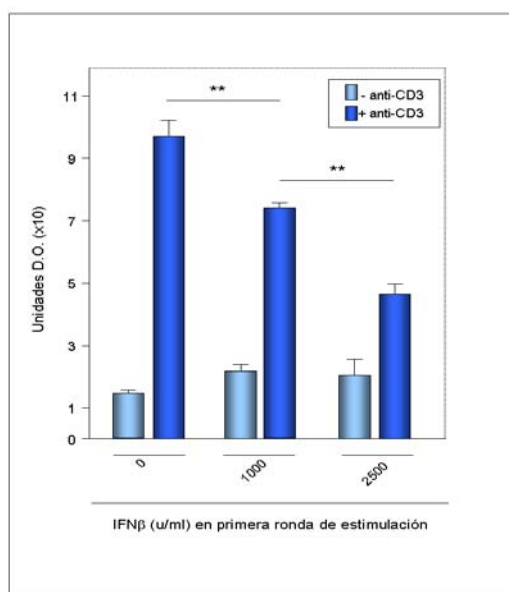


Figura 9. La capacidad proliferativa del cultivo $CD4^+$, no es restaurada por la eliminación del $IFN\beta$ durante la segunda ronda de activación por TCR. Las células T $CD4^+$ *naïve* fueron dirigidas hacia el fenotipo $Th0$ durante el proceso de diferenciación, en presencia de las dosis indicadas de $IFN\beta$. Después de 7 días, las células fueron re-estimuladas con anti-CD3 fijado a placa, en ausencia de $IFN\beta$ durante 72h y su proliferación fue determinada por ensayo colorimétrico con MTT.

1.1.2.- Actividad supresora de cultivos celulares $CD4^+$.

A continuación, se planteó la posibilidad de que la disminución de proliferación mediada por $IFN\beta$ estuviera relacionada con el porcentaje de células $CD4^+CD25^+$ (nTreg, supresoras de la proliferación de la fracción $CD4^+CD25^-$) presentes en la población $CD4^+$. Para determinar si $IFN\beta$ aumenta la capacidad supresora de cultivos $CD4^+$ activados con anti-CD3, se realizaron ensayos de supresión. En dichos ensayos se midió la capacidad proliferativa de células *naïve* ($CD4^+CD25^-$) cocultivadas con concentraciones crecientes de células $CD4^+$ que habían sido preactivadas en presencia o ausencia del fármaco durante 72 h. Como control de supresión mediada por células nTreg, se emplearon células $CD4^+CD25^+$ purificadas magnéticamente (> 70% de pureza).

Como se observa en la figura 10A, en las muestras control (nTreg), a medida que aumenta la proporción de células T reguladoras purificadas respecto a las efectoras, disminuye la respuesta proliferativa de células *naïve*. Aunque en menor medida, también se observó una inhibición de la proliferación de células *naïve* cocultivadas con células $CD4^+$ sometidas a una ronda de activación con anti-CD3. Esto es probablemente debido a la proporción de células nTreg ($CD4^+CD25^+$) supervivientes en la población de $CD4^+$. Cuando los cocultivos de células *naïve* se realizaron con células que habían sido preactivadas en presencia de $IFN\beta$, la inhibición de proliferación fue más acusada, indicando que $IFN\beta$ confiere una mayor capacidad supresora al cultivo tratado con este fármaco.

Para comprobar si la capacidad supresora de las poblaciones preactivadas podía ser asignada a células nTreg presentes en dichas muestras, analizamos la inhibición de proliferación cuando la población inicial es deplecionada de la fracción nTreg. En condiciones de depleción parcial (aproximadamente 2/3) de $CD4^+CD25^+$, se mantiene la diferencia entre los cultivos con y sin $IFN\beta$, mostrando una mayor actividad supresora cuando $IFN\beta$ ha estado presente en la preactivación. Por el contrario, si el cultivo es totalmente deplecionado de células $CD4^+CD25^+$ mediante purificación por *sorting*, la actividad supresora desaparece, independientemente de la presencia de $IFN\beta$ en la primera ronda de activación con anti-CD3 (Fig. 10B). Esto indica que la actividad supresora de células preactivadas sobre células *naïve* depende directamente de la fracción de células $CD4^+CD25^+$ presentes en la población inicial, por lo que muy probablemente la mayor actividad supresora de la población preactivada en presencia de $IFN\beta$ sea debida a una mayor proporción de células $CD4^+CD25^+$ existentes en dicho cultivo.

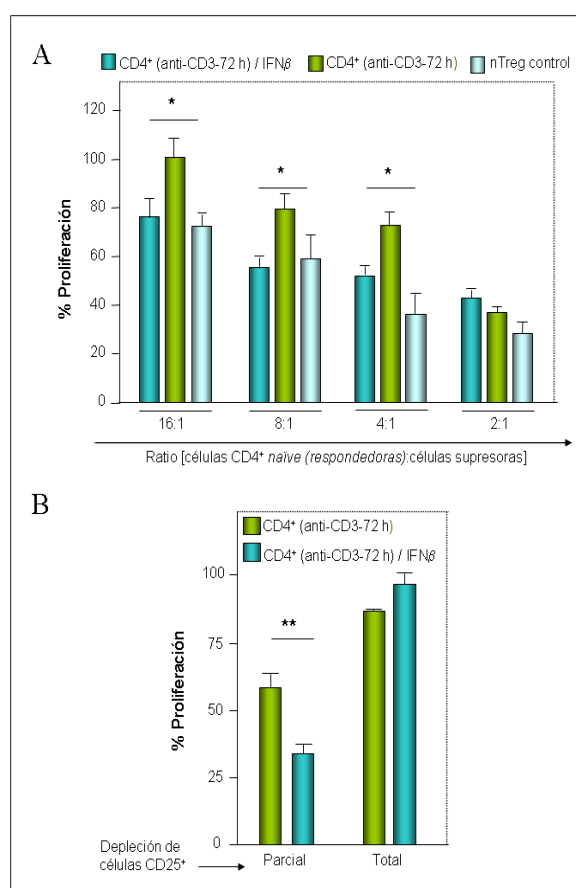


Figura 10. El defecto de proliferación producido por $IFN\beta$ en cultivos $CD4^+$ *naïve* está relacionado con la actividad supresora de células $CD4^+CD25^+$. (A) Ensayo de supresión de la proliferación determinada por ensayo de MTT de células $CD4^+$ *naïve* por células $CD4^+$ totales pre-estimuladas durante 72 h con anti-CD3 fijado a placa en presencia o ausencia de $IFN\beta$ (2500 u/ml). Una población enriquecida en $CD4^+CD25^+$ (>70%), fue utilizada como control de células supresoras (nTreg). (B) Células T $CD4^+$ *naïve*, parcialmente (2/3) o totalmente deplecionadas de células $CD25^+$, fueron estimuladas con anti-CD3 fijado a placa en presencia o ausencia de $IFN\beta$ (2500 u/ml). Después de 72h, se realizó el ensayo de supresión con un ratio de 8:1 (Respondedoras:Supresoras). Los valores de cada panel son representativos de tres experimentos independientes donde las muestras fueron realizadas por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

1.1.3.- Supervivencia de células nTreg en presencia de IFN β .

Las células nTreg, tienen una alta predisposición a la apoptosis espontánea (Taams *et al.*, 2001). Dado que se había observado una mayor actividad supresora en cultivos de células CD4⁺ tratados con IFN β , cabía la posibilidad de una mayor supervivencia de las células nTreg en dichos cultivos. Para determinar la capacidad de supervivencia en cultivo de este tipo celular se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real cuantificando la expresión de Foxp3 (factor nuclear característico de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺) después de 24, 48 y 72h de cultivo en presencia o ausencia de IFN β . En ambos casos, se observó una disminución de este factor a lo largo del tiempo, como es previsible dada la alta predisposición a la apoptosis que poseen las células Treg en cultivo. Sin embargo, el cultivo tratado con IFN β presentó una disminución de Foxp3 menos acusada que el cultivo sin tratamiento (Fig. 11A).

Por otra parte, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células Foxp3⁺ presentes en cultivos tratados o no con IFN β durante 72h (Fig. 11B). Partiendo de una población inicial de células CD4⁺ totales (Fig. 11Bi), después de 72h se observó un mayor porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en el cultivo tratado con IFN β , que en el cultivo únicamente activado con anti-CD3. Si el cultivo de partida era parcialmente deplecionado de células CD4⁺CD25⁺ (Fig. 11Bii), tras 72h se seguía observando un mayor porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ mediado por IFN β . Sin embargo, podemos descartar que IFN β propicie la generación *de novo* de células Foxp3⁺, ya que si el cultivo de partida es totalmente deplecionado de células CD4⁺CD25⁺, en el que por tanto no se detectan células Foxp3⁺, el tratamiento con IFN β no es capaz de inducir la aparición de nuevas células Foxp3⁺ (Fig. 11Biii). Este resultado sugiere que el mayor porcentaje de células Foxp3⁺, en los cultivos tratados con IFN β , corresponden a una mayor supervivencia de las células T reguladoras preexistentes en el cultivo inicial.

Quisimos saber si la mayor supervivencia de las células nTreg en el cultivo con IFN β estaba mediada por una menor apoptosis de este tipo celular, para lo que se realizaron ensayos de Anexina-V-FITC. Como puede verse en la (Fig. 12Ai), la tinción con Anexina-V-FITC de una población pura de nTreg tratada con IFN β , demostró que la alta propensión de las células nTreg a la apoptosis era significativamente disminuida por el tratamiento. Además, se analizó la expresión del factor antiapoptótico Bcl-x_L (Fig. 12Aii) mediante RT-PCR en tiempo real, detectando un aumento en la expresión de dicho

factor en el cultivo de células $CD4^+CD25^+$ en presencia de $IFN\beta$. Este efecto protector frente a apoptosis sobre células nTreg, no deriva de un efecto general del $IFN\beta$ sobre la apoptosis de células $CD4^+$, como indica el resultado del análisis de Anexina-V realizado sobre células $CD4^+$ totales (Fig. 12B).

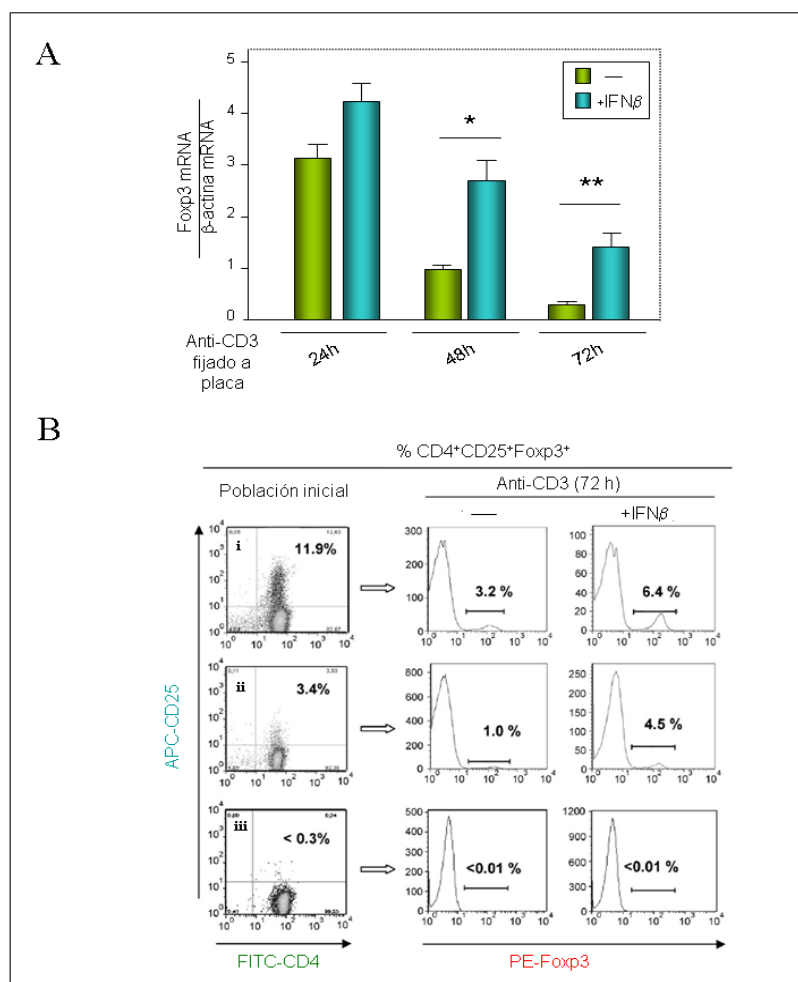


Figura 11. El decaimiento de células $CD4^+Foxp3^+$ en cultivos primarios $CD4^+$ *in vitro* es reducido por $IFN\beta$. (A) Células $CD4^+$ naïve fueron estimuladas con anti-CD3 sólo o combinado con $IFN\beta$ (2500 U/ml). Los niveles de mRNA de Foxp3 fueron medidos por RT-PCR en tiempo real a los tiempos indicados. Los resultados para cada muestra fueron normalizados con los valores obtenidos para β -Actina. (B) Porcentaje de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ en cultivo de células $CD4^+$ después de 72h con activación por anti-CD3 en presencia o ausencia de $IFN\beta$. La población de partida fue un cultivo de células $CD4^+$ totales (Bi), o una población $CD4^+$ deplecionada parcial (Bii) o totalmente (Biii) de la fracción $CD4^+CD25^+$. Cada población inicial fue marcada en superficie con un doble marcaje con anti-CD4-FITC y anti-CD25-APC. Los números en cada sub-panel indican el porcentaje de células Foxp3⁺ determinadas por tinción intracelular después de 72h. Se muestra el resultado de uno de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

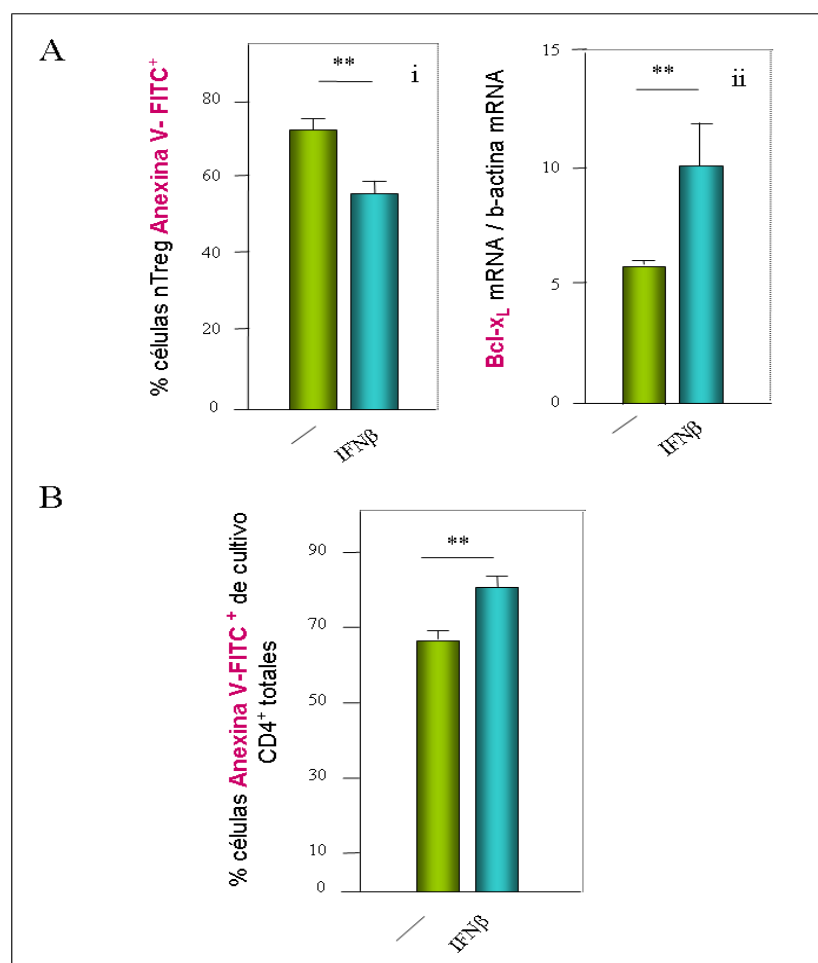


Figura 12. El tratamiento con IFN β rescata a las células nTreg de la apoptosis espontánea. La fracción CD4⁺CD25⁺ (A) o la población CD4⁺ *naïve* total (B) fueron cultivadas en presencia de anti-CD3 con o sin 2500 U/ml de IFN β . Después de 24–48 h, las células fueron teñidas con AnexinaV-FITC y Ioduro de Propidio determinando el número de células AnexinaV-FITC positivas mediante análisis por citometría de flujo (Ai y B). El mRNA de Bcl-xL fue cuantificado por RT-PCR en tiempo real (Aii). Se muestran los datos de un experimento representativo de tres experimentos independientes, donde cada muestra fue ensayada por duplicado. ** $p < 0.01$.

1.1.4.- Expresión de citoquinas proinflamatorias en cultivos de células CD4⁺

Para saber si la presencia de IFN β en cultivos de células CD4⁺ durante la primera ronda de activación con anti-CD3 tenía algún efecto en los niveles de citoquinas proinflamatorias, analizamos la expresión de IFN- γ e IL-17 en estos cultivos. El análisis fue realizado 3 y 7 días después de la estimulación primaria con anti-CD3 (D3 y D7, respectivamente). A D7 ambas citoquinas eran expresadas a muy bajos niveles (Fig. 13A), probablemente debido a que las células a D7 están más cercanas al estado de reposo, que a D3. El IFN β no produce ningún efecto en la producción de IFN- γ , mientras que la expresión de IL-17, tanto a nivel de mRNA (Fig. 13Aii), como a nivel de proteína

(Fig.13B), se vio drásticamente inhibida como resultado del tratamiento *in vitro* con IFN β a cualquiera de los tiempos analizados.

Si las células CD4⁺CD25⁺, son deplecionadas del cultivo inicial, la presencia de IFN β no es capaz de mediar la disminución de la expresión de IL-17 (Fig. 13C). A la vista de este resultado se puede deducir que la presencia de células nTreg está directamente implicada en la disminución de IL-17 mediada por IFN β .

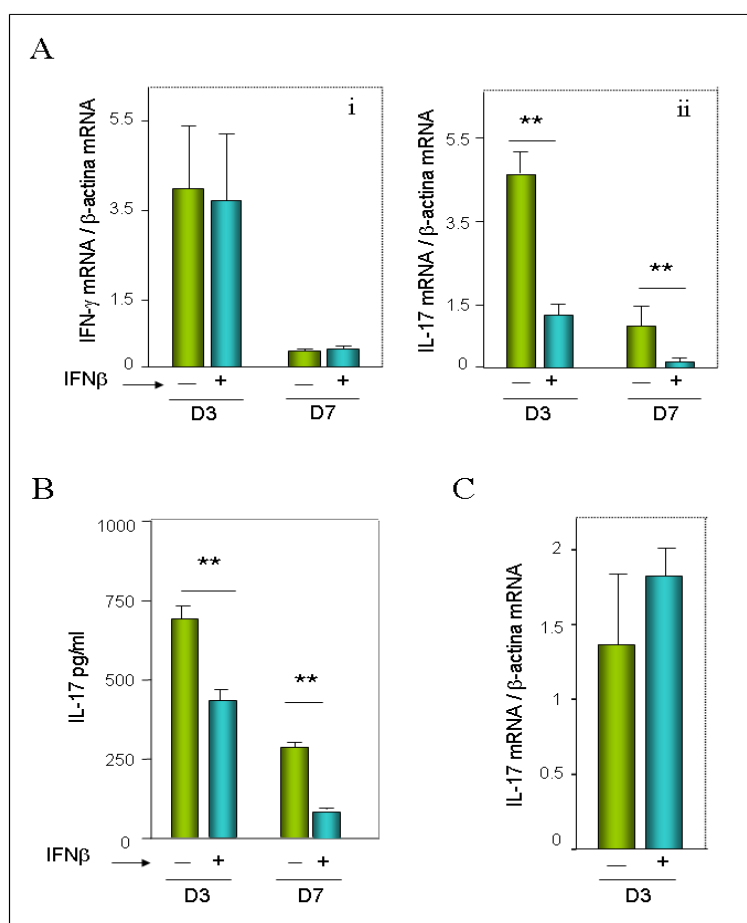


Figura 13. IFN β disminuye los niveles de expresión de IL-17 en células CD4⁺ dependiendo de la presencia de células CD25⁺. Células CD4⁺ *naïve* totales (A–B), o la fracción CD4⁺CD25⁻ (C), fueron estimuladas con anti-CD3 fijado a placa, solo o en presencia de IFN β (2500 U/ml). Después de 3 ó 7 días (D3 y D7) de cultivo, se cuantificaron los niveles de expresión de IFN- γ e IL-17. Los niveles de mRNA se midieron por RT-PCR en tiempo real (A y C), y los de proteína secretada por ELISA (B). Los resultados para el mRNA fueron normalizados con los valores obtenidos para β -actina en cada muestra. Se muestran los datos de un experimento representativo de tres experimentos independientes, donde cada muestra fue ensayada por duplicado. ** $p < 0.01$.

1.2.- TRATAMIENTO CON IFN β *IN VIVO*.

Resultados previos de nuestro laboratorio habían mostrado una disminución y retraso de los síntomas clínicos en el modelo animal de EAE-MBP en ratones SJL tratados con IFN β , además de una reducción de los infiltrados perivasculares en SNC (Martin-Saavedra *et al.*, 2007) (Figura 5 de Introducción). Quisimos comprobar si en el modelo animal el porcentaje de células nTreg y los niveles de expresión de IL-17 estaban afectados por el tratamiento con IFN β de acuerdo con los resultados obtenidos para el tratamiento *in vitro*.

1.2.1.- Porcentaje de células CD4⁺CD25⁺.

Tras la inducción activa de EAE-MBP en ratones SJL se procedió al sacrificio de los animales en la fase aguda de la enfermedad (D9-11 después de la inoculación de antígeno). Cuando se cuantificó el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ en cada uno de los grupos, se pudo comprobar un ligero, pero consistente, aumento de estas células en los bazo de animales tratados con IFN β respecto a los controles sin tratamiento (Fig. 14A). Un incremento similar se encontró al utilizar un marcaje específico para células nTreg con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25, anti-GITR y anti-Foxp3 (Fig. 14B), sugiriendo que también *in vivo* el tratamiento con IFN β permite una mayor supervivencia de células nTreg

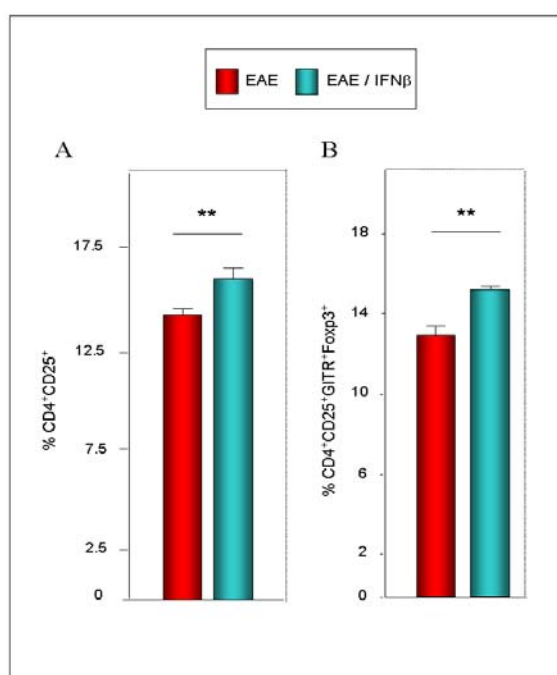


Figura 14. El tratamiento con IFN β en ratones SJL inducidos a EAE-MBP, promueve la acumulación de células nTreg en bazo. Los grupos de animales fueron EAE (sin tratamiento) y EAE/IFN β (tratados con IFN β), con siete animales por grupo. Se sacrificaron a día 9 p.i. y se estableció un “pool” de células de bazo para cada grupo. (A) El porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ fue determinado por doble marcaje en superficie con anti-CD4-APC y anti-CD25-PECy7. (B) Para las mismas muestras se utilizó un marcaje con 4 colores: anticuerpos anti-CD4-FITC, anti-CD25-PECy7 y anti-GITR-APC, y marcaje intracelular con anti-Foxp3-PE. Los valores mostrados son las medias de tres medidas independientes. ** $p < 0.01$.

1.2.2.- Niveles de expresión de IL-17.

Para determinar si la inhibición de expresión de IL-17, mediada por IFN β *in vitro*, se correspondía con una disminución de esta citoquina proinflamatoria durante el tratamiento *in vivo*, se cuantificó su expresión mediante RT-PCR en tiempo real en células de órganos periféricos. En estos ensayos, se vio un aumento de la expresión de IL-17 en animales en los que había sido inducida la enfermedad, respecto a los controles sanos. Cuando los animales habían sido tratados con IFN β durante el curso de la enfermedad, tuvo lugar una disminución significativa de los niveles de esta citoquina. El resultado fue idéntico al utilizar células obtenidas de bazo o de ganglio (Fig. 15).

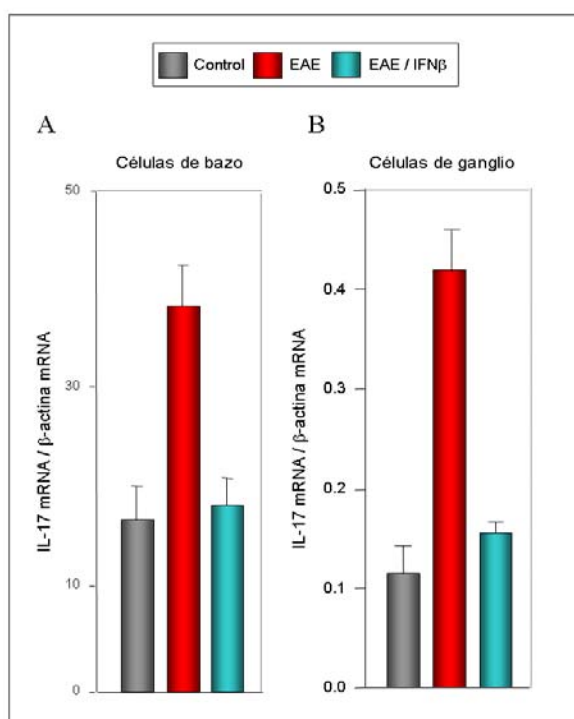


Figura 15. El tratamiento *in vivo* con IFN β en el modelo animal MBP-EAE, provoca una disminución de la expresión de IL-17 en bazo y ganglio. Se indujo EAE mediante MBP en ratones SJL/J. Los grupos de animales establecidos fueron: Control (a los que no se inoculó MBP), EAE (a los que se inoculó MBP) y EAE/IFN β (a los que, además de MBP, se les inoculó IFN β), con siete animales por grupo. En la fase aguda de la enfermedad se sacrificaron los ratones y se obtuvieron bazos (A) y ganglios (B). Mediante RT-PCR en tiempo real se determinó la expresión de IL-17 para cada grupo de animales. Los valores para IL-17 fueron referenciados al valor obtenido para β -actina en cada muestra.

Puesto que en el curso de la enfermedad aparecen infiltrados de células T autoreactivas en el SNC, (McFarland and Martin, 2007), quisimos determinar si, además de en órganos periféricos, el tratamiento con IFN β tenía consecuencias en los niveles de expresión de IL-17 en SNC. Para ello, se cuantificaron los niveles de mRNA de IL-17 en infiltrados de médula espinal. Como demuestra la figura 16, en animales tratados con IFN β , los niveles de expresión de IL-17 son menores que en animales sin tratar. Esto pudo ser comprobado tanto en células mononucleares totales como en células reactivas

específicamente a MBP. Estos resultados obtenidos *in vivo* correlacionan con los obtenidos tras el tratamiento *in vitro* con IFN β .

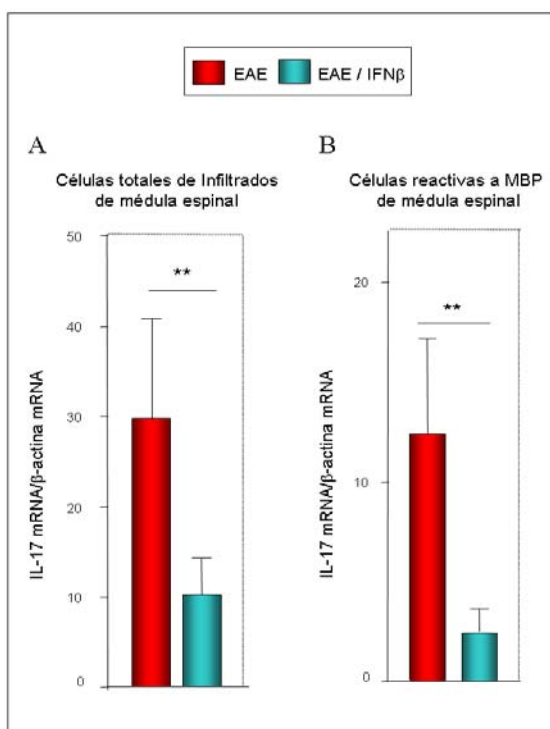


Figura 16. El tratamiento *in vivo* con IFN β en el modelo animal MBP-EAE, provoca una disminución de la expresión de IL-17 en SNC. Los animales fueron sacrificados en la fase aguda de la enfermedad y obtenidas las muestras de médula espinal. La disminución de IL-17 en el grupo de animales tratados con IFN β pudo observarse por RT-PCR, tanto en células totales de los infiltrados de médula espinal (A) como en células de la médula espinal reactivas a MBP (B). Los resultados obtenidos por PCR del gen de IL-17 fueron referenciados al valor obtenido para el gen *housekeeping* β -actina en cada muestra.

2.- EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE PDE4 Y PDE7 SOBRE LINFOCITOS T.

Otro de los objetivos de nuestro trabajo, ha sido el análisis de las posibilidades que presenta la inhibición de PDEs como terapia anti-inflamatoria y neuroprotectora. En concreto nuestro interés se ha centrado en la comparación de los efectos producidos por la inhibición de PDE4 ó PDE7, y por la posible sinergia de la inhibición de ambas PDEs.

Para realizar ensayos de inhibición de PDE y determinar sus efectos sobre linfocitos T, empleamos los inhibidores comerciales de PDE4 y PDE7, Rolipram y BRL50481 respectivamente. También utilizamos una serie de inhibidores diseñados y sintetizados en el laboratorio de las Dras. Ana Martínez y Carmen Gil, en el Instituto de Química Médica del CSIC. Parte de nuestro estudio ha consistido en la caracterización de los efectos biológicos sobre linfocitos T de estos inhibidores de nueva síntesis. Los valores de IC₅₀ de cada uno de ellos fueron determinados en el laboratorio del Dr. Hedming Ke en la Universidad de Carolina del Norte (Tabla 5).

Compuesto	Especificidad (IC ₅₀ μM)
Rolipram	PDE4 (0,55 ± 0,05)
BRL50481	PDE7 (0,26)
S14	PDE7 (5,5) / PDE4 (21,7)
S28	PDE7 (1,9) / PDE4 (56)
TC2.43	PDE7 (0,51 ± 0,02) / PDE4 (3,5 ± 0,3)
TC3.15	PDE7 (~1) / PDE4 (N.D.)
TC3.23	PDE7 (0,13 ± 0,02) / PDE4 (1,4 ± 0,2)
TC3.22	PDE7 (0,27 ± 0,02) / PDE4 (1,1 ± 0,2)
TC3.6	PDE7 (1,04 ± 0,08) / PDE4 (5,7 ± 0,03)
TC2.49	PDE7 (~1) / PDE4 (N.D.)
TC3.9	PDE7 (0,84 ± 0,01) / PDE4 (8 ± 1,2)
TC3.1	PDE7 (0,1-1) / PDE4 (N.D.)
TC3.13	PDE7 (0,1-1) / PDE4 (N.D.)
TC2.47	PDE7 (0,8 ± 0,2) / PDE4 (N.D.)
TC2.44	PDE7 (0,41 ± 0,03) / PDE4 (1,6 ± 0,4))
TC3.3	PDE7 (0,1-1) / PDE4 (N.D.)
TC3.14	PDE7 (1,7 ± 0,1) / PDE4 (34 ± 5)
TC3.36	PDE7 (0,24 ± 0,03) / PDE4 (4,5 ± 0,1)
TC3.32	PDE7 (2,1 ± 0,1) / PDE4 (N.D.)
TC3.35	PDE7 (1,86 ± 0,18) / PDE4 (N.D.)

Tabla 5: Valores de las IC₅₀ de cada uno de los inhibidores de PDE4 y PDE7, comerciales y de nueva síntesis, que fueron analizados en el laboratorio del Dr. Hedming Ke de la Universidad de Carolina del Norte. Comerciales, Rolipram y BRL 50481. El resto de inhibidores mostrados corresponden a inhibidores sintetizados en el laboratorio de las Dras. Ana Martínez y Camen Gil, del Instituto de Química Médica

2.1.- TRATAMIENTO *IN VITRO* DE CÉLULAS T DE FENOTIPO Th DEFINIDO CON INHIBIDORES DE PDE4 Y PDE7.

2.1.1.- Medidas de toxicidad de inhibidores de PDE4 y PDE7.

En primer lugar, se realizaron ensayos de toxicidad celular para determinar el efecto tóxico de los inhibidores comerciales y de los de nueva síntesis sobre el clon de linfocitos T D10.G4.1. Dichos ensayos se llevaron a cabo mediante el análisis por citometría de flujo de la incorporación de Ioduro de Propidio en células tratadas durante 48h con concentraciones crecientes de los distintos inhibidores (Fig. 17). En estos ensayos se comprobó que, tanto Rolipram como BRL50481, presentan una toxicidad moderada a concentraciones relativamente altas. Sin embargo, varios de los inhibidores de nueva síntesis (TC2.43, TC3.23, TC3.22, TC2.49, TC3.1, TC3.13, TC2.47, TC2.44, TC3.36, TC3.32 y TC3.35) son altamente tóxicos (viabilidad inferior al 50%) a concentraciones bajas (inferiores a 100 μM), por lo que fueron descartados para el resto de ensayos de actividad celular.

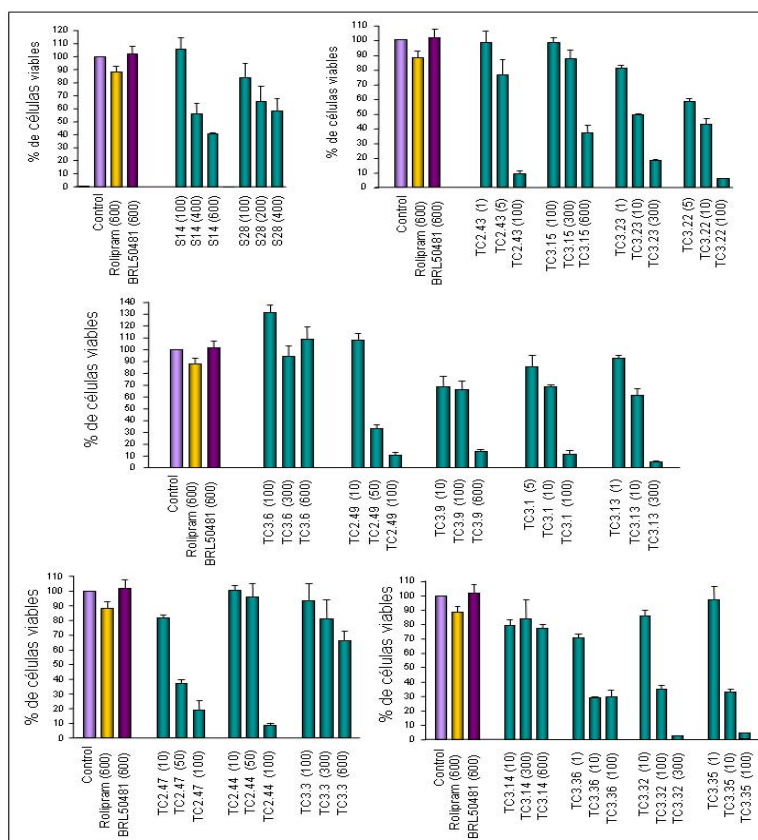


Figura 17. Ensayos de toxicidad celular de los inhibidores de PDE4 y PDE7. Células D10.G4.1 ($0.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron cultivadas en presencia de los inhibidores de PDE indicados. Después de 48 h se analizó la incorporación de IP en los cultivos mediante citometría de flujo. El porcentaje de células viables corresponde a la fracción de células que no incorporaron IP. Entre paréntesis se indica en μM las concentraciones de los inhibidores de PDE utilizadas en cada caso. Los valores de cada panel son representativos de tres experimentos independientes donde las muestras fueron ensayadas por triplicado. Los resultados fueron referidos al control sin inhibidor (100% de células viables).

2.1.2.- Niveles de AMPc intracelular en el clon D10.G4.1 producidos por la inhibición de PDE4 y PDE7.

Tras el análisis de toxicidad de los inhibidores de PDE, se comprobó si los compuestos de nueva síntesis eran capaces de modificar los niveles de AMPc intracelular en células D10.G4.1. Para ello, se realizaron enzoinmunoensayos competitivos. Las células fueron incubadas durante 1h en presencia de una concentración de 500 μM de los inhibidores de nueva síntesis y del inhibidor comercial de PDE7 BRL50481, mientras que para Rolipram fue empleada una concentración de 50 μM , de acuerdo a su baja IC_{50} para PDE4, mayoritaria en linfocitos T. Tras esta incubación se llevó a cabo la

cuantificación de AMPc intracelular. En la figura 18 se representan los resultados obtenidos para los inhibidores comerciales y los inhibidores de nueva síntesis no descartados por su toxicidad (TC3.9, TC3.3, TC3.15, S14, TC3.6, TC3.14 y S28). Como se puede comprobar en dicha figura, la inhibición de PDE4 por Rolipram es más efectiva que la inhibición de PDE7 por BRL50481 en el aumento de los niveles de AMPc intracelular, aunque este inhibidor de PDE7 también aumenta significativamente los niveles por encima del control. Los compuestos TC3.9, S14, TC3.6 y TC3.14, también fueron capaces de aumentar significativamente estos niveles respecto a las muestras control. Sin embargo, aunque TC3.9 y TC3.6, son inhibidores duales de PDE4 y PDE7, los niveles de AMPc producidos por la acción de estos compuestos, fueron muy inferiores a los obtenidos con Rolipram. Esto puede explicarse por el valor de IC_{50} de cada uno para PDE4, ya que es respectivamente 14.5 y 10.4 veces superior que en el caso de Rolipram. No obstante, no se pudo observar una total linearidad entre las IC_{50} determinadas *in vitro* y el aumento de AMPc intracelular. Los compuestos TC3.3, TC3.15 y S28, que no indujeron aumento de los niveles de AMPc intracelular, fueron descartados para el resto de los ensayos.

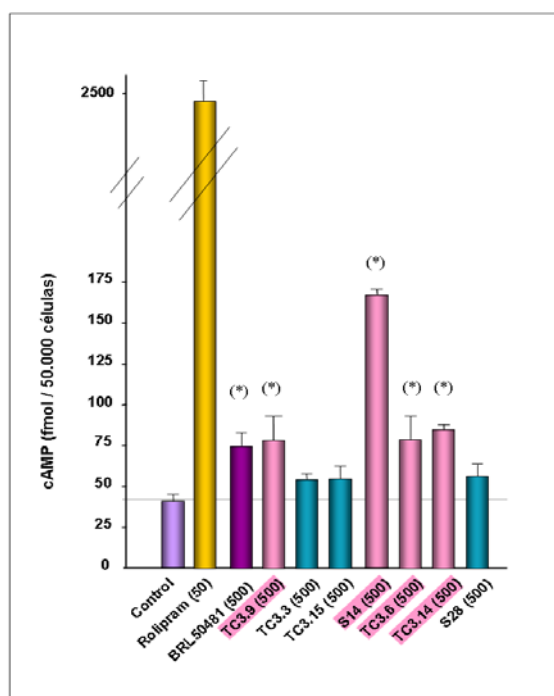


Figura 18. Niveles de AMPc intracelular producidos por la inhibición de PDE4 y PDE7, con los inhibidores comerciales Rolipram y BRL50481 y los inhibidores de nueva síntesis. Los niveles de AMPc intracelular han sido determinados mediante ensayo inmunoquímico competitivo de Amersham, en el clon de linfocitos D10.G4.1, tras el tratamiento de dicho clon con la concentración (μ M) indicada para cada inhibidor durante 1h. Los resultados obtenidos son representativos de tres experimentos independientes donde las muestras fueron realizadas por triplicado.

2.1.3.- Influencia de los inhibidores de PDE sobre la actividad efectora del clon de linfocitos D10.G4.1.

Los linfocitos T, en respuesta a la activación por el TCR, tienen una alta capacidad proliferativa y de producción de citoquinas efectoras para mediar la respuesta inmune. Una buena característica de los inhibidores de PDE empleados podría ser la disminución de proliferación de células T, ya que esto disminuiría las posibilidades de infiltración de células autorreactivas a través de la BHE.

Para analizar esta posibilidad se ensayó la capacidad proliferativa de linfocitos T, utilizando el clon D10.G4.1, en respuesta a estímulo vía TCR estimulando con anti-CD3 en presencia de los inhibidores de PDE. Para todos los inhibidores ensayados se utilizaron concentraciones en las que la viabilidad celular no es afectada para asegurar que la posible disminución de proliferación no estuviera mediada por muerte celular debida a un efecto tóxico de los inhibidores. Después de 72h se analizó su proliferación mediante MTT y ensayo colorimétrico. Se observó una disminución significativa de la proliferación con cada uno de los inhibidores comerciales y de los de nueva síntesis, a excepción del inhibidor TC3.9, el cual fue descartado por no poseer un efecto antiproliferativo sobre linfocitos T (Fig. 19A).

Para saber si la inhibición de PDE4 y PDE7 afectaba también a la expresión de la principal citoquina efectora producida por la línea celular Th2 D10.G4.1, se determinó la expresión de IL-4. En la figura 19B, se representan los niveles de mRNA y de proteína IL-4 producidos por células D10.G4.1 que han sido activadas con anti-CD3 en condiciones de inhibición de PDE, respecto al control sin inhibidor. Estos resultados indican que los niveles de mRNA y la cantidad de IL-4 secretada, son disminuidos tanto por la inhibición de PDE4 (por Rolipram), como por la inhibición de PDE7 (por BRL50481 o por S14), aunque el efecto de la inhibición de PDE4 es más acusado que el de la inhibición de PDE7. Para descartar que la disminución en los niveles de expresión de IL-4 fuera debido a un menor número de células por la inhibición de la proliferación, los niveles de proteína que se muestran en la figura 19Bii han sido referidos a los valores de proliferación en cada caso. Asimismo, en la figura 19Bi los niveles de mRNA para IL-4 están normalizados a los de β -actina.

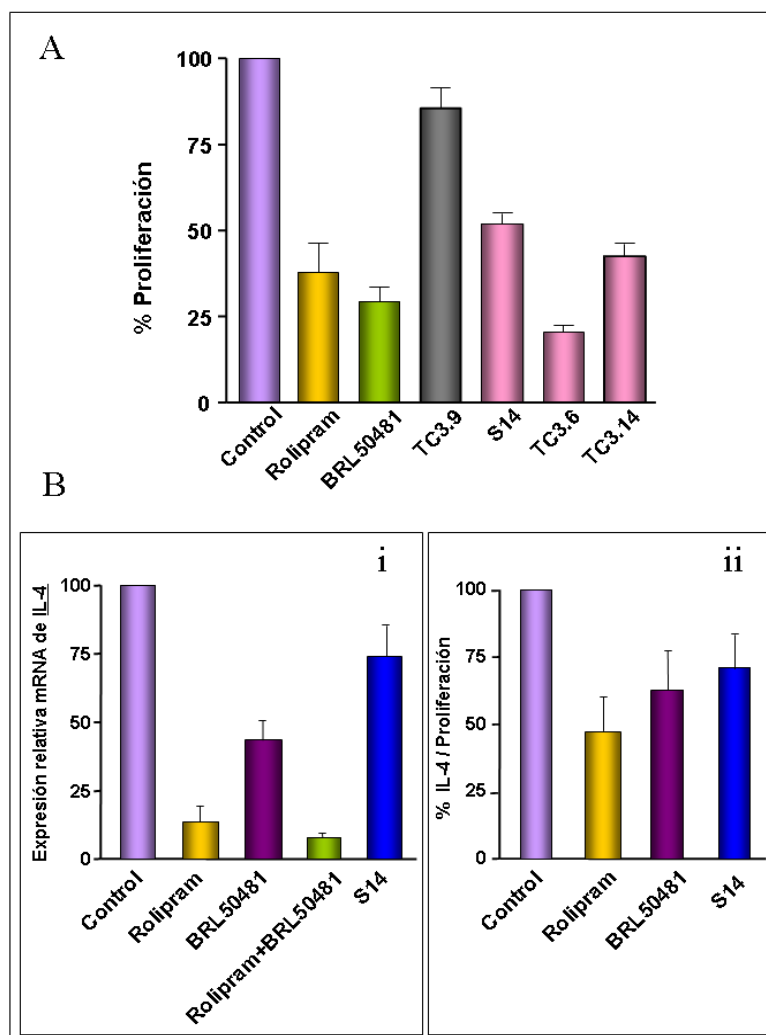


Figura 19. El clon de linfocitos D10.G4.1 fue activado con anti-CD3 fijado a placa, en presencia o ausencia de una concentración de 200 μ M de cada uno de los inhibidores comerciales o de nueva síntesis, indicados en la figura. (A) Mediante ensayo colorimétrico con MTT, fue determinada la proliferación celular de dicho clon, tras 72h de activación con anti-CD3. (B) Cuantificación de los niveles de IL-4 en el clon D10.G4.1, (Bi) mediante RT-PCR en tiempo real tras el estímulo de las células con anti-CD3 durante 4h y (Bii) por ELISA de los sobrenadantes de los cultivos empleados para determinar la proliferación celular. Los resultados fueron referidos al control sin inhibidor (100%).

2.1.4.- Niveles de AMPc intracelular producidos por la inhibición simultánea de PDE4 y PDE7.

Una vez descartados los compuestos sin efecto antiproliferativo y los que no aumentaban los niveles de AMPc por encima del control, quisimos determinar si la combinación de inhibidores de PDE4 y PDE7 podría aumentar los niveles de AMPc por encima de los producidos únicamente por la inhibición de PDE4, es decir, si habría un

efecto sinérgico, producido por la inhibición simultánea de ambas PDEs. En la figura 20A se presentan los resultados obtenidos para los inhibidores comerciales y para el inhibidor de nueva síntesis TC3.6 (inhibidor dual para PDE7 y PDE4, según Tabla 2). La inhibición simultánea de ambas PDEs (PDE4 y PDE7), empleando Rolipram y BRL50481 ó TC3.6 tuvo un efecto sinérgico en el aumento de los niveles de AMPc intracelular.

El aumento en los niveles de AMPc intracelular tiene como diana principal la proteína kinasa A (PKA), que participa en procesos celulares entre los que destaca la fosforilación de la familia de factores de transcripción CREB (Shaywitz and Greenberg, 1999) que se unen a elementos de DNA en los promotores de genes que responden a AMPc para regular su expresión génica. Para determinar el efecto de los inhibidores seleccionados sobre este factor de transcripción, debido al aumento de AMPc que producen los mismos, se llevaron a cabo transfecciones transitorias en células D10.G4.1, con un vector que posee el gen de la luciferasa bajo el control de un elemento de respuesta al factor de transcripción CREB. Las células ya transfectadas, fueron incubadas durante 4h con cada uno los inhibidores indicados en la figura 20B. La medida de actividad luciferasa para este factor de transcripción, aumentó significativamente mediante la inhibición de PDE4 por Rolipram, respecto a los controles sin inhibidor. La combinación de inhibidores de PDE4 (Rolipram) y PDE7 (BRL50481) produjo un efecto sinérgico en el aumento de actividad luciferasa para el factor de transcripción CREB. Sin embargo, ni BRL50481, ni TC3.6 fueron capaces de aumentar esta actividad de manera significativa cuando fueron ensayados individualmente.

2.1.5.- Actividad de factores de transcripción implicados en la función de células T.

Además del factor de transcripción CREB, existen otros muchos factores de transcripción implicados en distintos procesos celulares que son activados tras la estimulación del linfocito T. Una vez activada la célula T, se ponen en marcha una serie de cascadas que hacen que estos factores de transcripción sean activados y se transloquen al núcleo uniéndose al DNA y regulando la transcripción de diversos genes necesarios para la actividad efectora. Quisimos saber si la inhibición de PDE4 y/o 7 afecta a tres de los factores de transcripción más significativos en la activación de células T: NFAT, NFκB y Stat6.

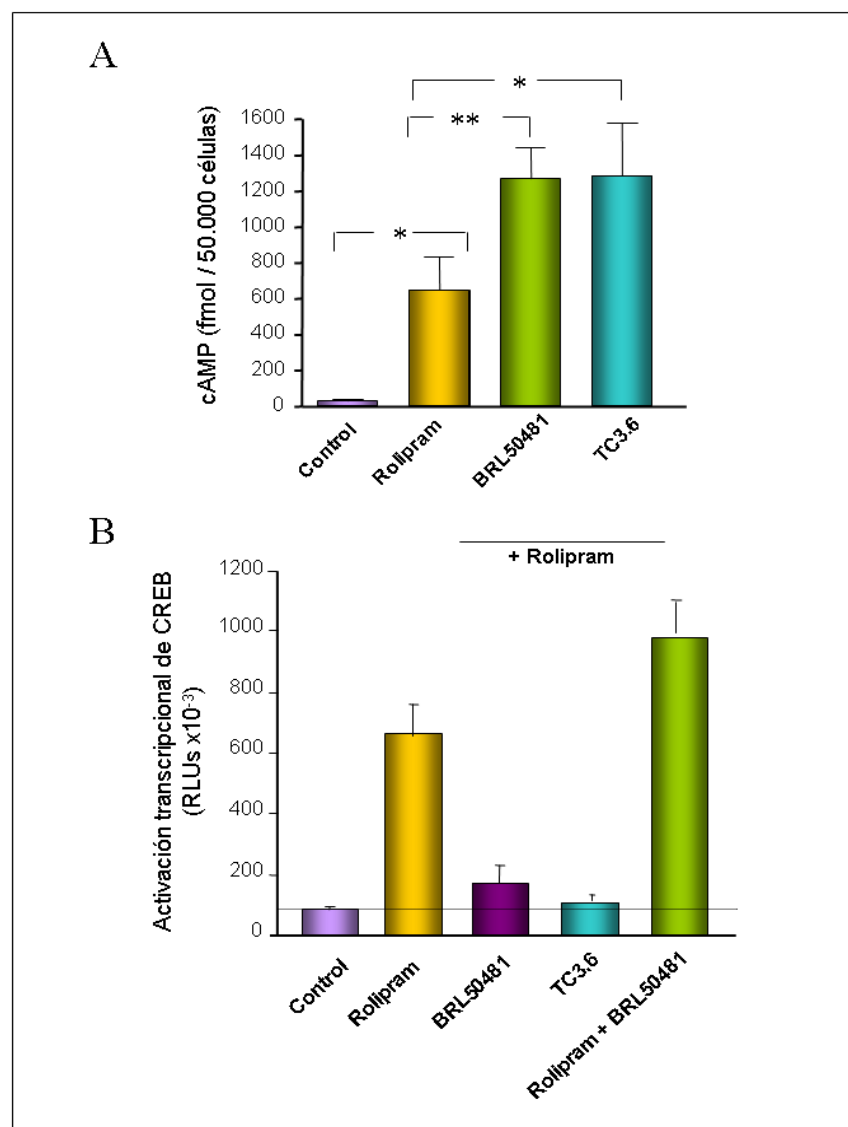


Figura 20. (A) Niveles de AMPc intracelular en el clon D10.G4.1 producidos por la inhibición simultánea de PDE4 y PDE7. El inhibidor utilizado se especifica en cada caso. Los niveles de AMPc intracelular fueron determinados mediante ensayo inmunoensayo competitivo, tras el tratamiento de las células durante 1h con una concentración 200μM de cada uno de los inhibidores. (B) Medida de la actividad del factor de transcripción CREB, en células D10.G4.1 mediante transfecciones transitorias con pGL4.29 que contiene el gen de luciferasa unido a un elemento de respuesta a CREB. Las transfecciones fueron realizadas por triplicado, tratando cada una de las muestras con los inhibidores de PDE que se indican a una concentración de 50μM durante 4h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Para determinar el efecto de los inhibidores de PDE sobre NFAT, se llevaron a cabo ensayos de medida de actividad luciferasa. Se realizaron transfecciones transitorias por electroporación en el clon de células D10.G4.1, con el vector pGL4.30 que posee el gen de la luciferasa unido a un elemento de respuesta a NFAT. Estas células transfectadas fueron incubadas durante 24h con cada uno de los inhibidores de PDE4 y PDE7

indicados en la figura 21. Como puede observarse en la figura 21A, la actividad luciferasa no fue modificada por ninguno de los inhibidores indicados. Por lo que la activación de NFAT no parece estar afectada por la inhibición de estas PDEs.

Por otra parte, se analizó el efecto de la inhibición de PDE4 y PDE7 sobre la capacidad transactivadora de NF- κ B. Mediante transfección transitoria con la construcción κ B-pGL3-prom, que contiene un hexámero del sitio κ B de MMP-9 insertado en el sitio XhoI de pGL3-promoter, y tras la incubación de estas células durante 24h con los inhibidores de PDE4 y PDE7, se determinó la actividad luciferasa para este factor de transcripción. En la figura 21B se muestra que la actividad luciferasa mediada por este factor, únicamente es afectada significativamente por la inhibición de PDE4 por Rolipram, el cual produce una disminución de la actividad promotora.

Para la determinación de la actividad de Stat6 se utilizó la construcción P1-mutNFAT en el vector pGL3-promoter, que contiene el elemento de reconocimiento para Stat6 del sitio P1 del promotor de IL-4 (Dorado *et al.*, 2002). Los resultados se muestran en la figura 21C donde se observa un aumento de la actividad transcripcional del factor Stat6 mediado por la inhibición de PDE4 con el inhibidor comercial, Rolipram. El resto de inhibidores no mostró ningún efecto significativo.

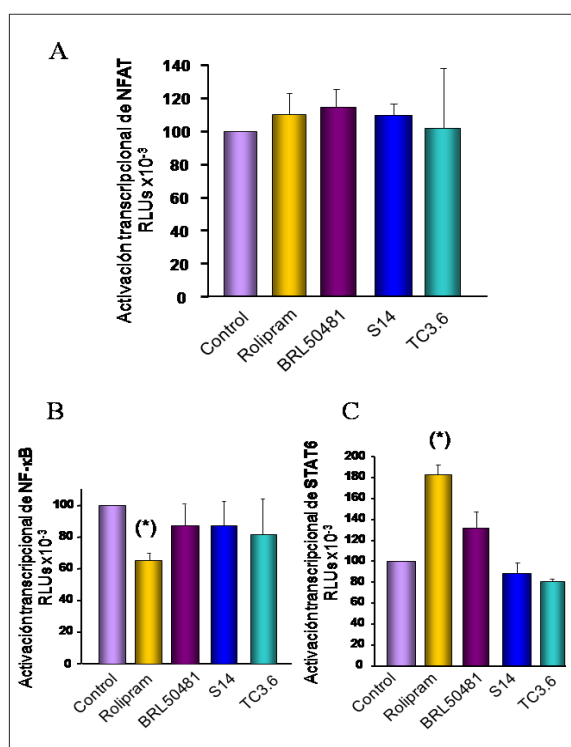


Figura 21. Efecto de los inhibidores de PDE4 y PDE7 sobre la actividad luciferasa en células D10.G4.1 transfectadas transitoriamente con vectores que poseen el gen de la luciferasa bajo el control de un elemento de respuesta a NFAT (pGL4.30) (A), NF- κ B (κ B-pGL3-prom) (B) o a STAT6 (P1-mutNFAT) (C). Las células fueron cotransfectadas con el plásmido pRL-TK que contiene el cDNA que codifica para Renilla luciferasa. La actividad Renilla luciferasa, se empleó como medida de la eficiencia de la transfección. Cada una de las muestras fue ensayada por triplicado, incubando las células transfectadas con una concentración de 50 μ M de cada uno de los inhibidores de PDE que se indican, durante 24h. Cada una de las gráficas muestra un experimento representativo de 3 independientes. Los resultados fueron referidos al control sin inhibidor (100%).

2.1.6.- Efecto sobre la actividad de los diferentes subtipos de células T cooperadoras.

Posteriormente quisimos analizar si el efecto antiproliferativo de la inhibición de PDEs que habíamos encontrado para el clon Th2 D10.G4.1 podría ser generalizado para los tres fenotipos de células T cooperadoras (Th). Para ello, se llevaron a cabo ensayos de diferenciación de células $CD4^{+}$ *naïve* hacia cada uno de los tres subtipos Th: Th1, Th2 y Th17. Se purificaron células $CD4^{+}$ a partir de bazos de ratones C3H y se cultivaron en presencia de IL-12, para inducir la definición a fenotipos Th1; IL-4, para Th2; o $TGF\beta$ +IL-6, para Th17; o en ausencia de citoquinas diferenciadoras, para Th0 (apartado 8 de Materiales y Métodos). En estas condiciones, al cabo de 7 días cada uno de los cultivos expresa mayoritariamente las interleuquinas características de cada subtipo celular: IFN- γ , para Th1; IL-4 para Th2; e IL-17 para Th17 (Fig. 22A). Una vez diferenciadas durante siete días (D7) hacia cada subtipo celular, se determinó su proliferación celular, sometiendo cada uno de los cultivos a una segunda ronda de activación con anti-CD3 en presencia de cada uno de los inhibidores. El resultado, que se observa en la figura 22B, mostró que el efecto antiproliferativo que la inhibición de PDE4 ó PDE7 confiere a las células T no es característico de ninguno de los distintos subtipos celulares, sino que es un efecto general sobre linfocitos Th ya diferenciados (Fig. 22B). Para determinar si este efecto se detectaba en estadios más tempranos de la diferenciación, se utilizó el cultivo celular Th0 (mezcla de todos los fenotipos) después de tres días de diferenciación (D3), viendo que el efecto de los inhibidores era similar al encontrado en células diferenciadas durante 7 días.

Además de la proliferación celular, fue analizada la expresión y producción de citoquinas características de cada uno de los subtipos celulares en presencia de los inhibidores de PDE. En el caso del fenotipo celular Th1, se cuantificó la expresión de su citoquina característica IFN- γ . Como se observa en la figura 23, la inhibición de PDE4 condujo a una disminución de los niveles de mRNA de IFN- γ , mientras que la inhibición de PDE7 por BRL50481 no produjo efecto significativo en estos niveles. La inhibición simultánea de PDE4 por Rolipram y de PDE7 por BRL50481 ó S14 llevó también a disminuir la cantidad de mRNA para IFN- γ . Los niveles de esta citoquina secretados al medio extracelular determinados por ELISA también fueron menores en presencia de Rolipram.

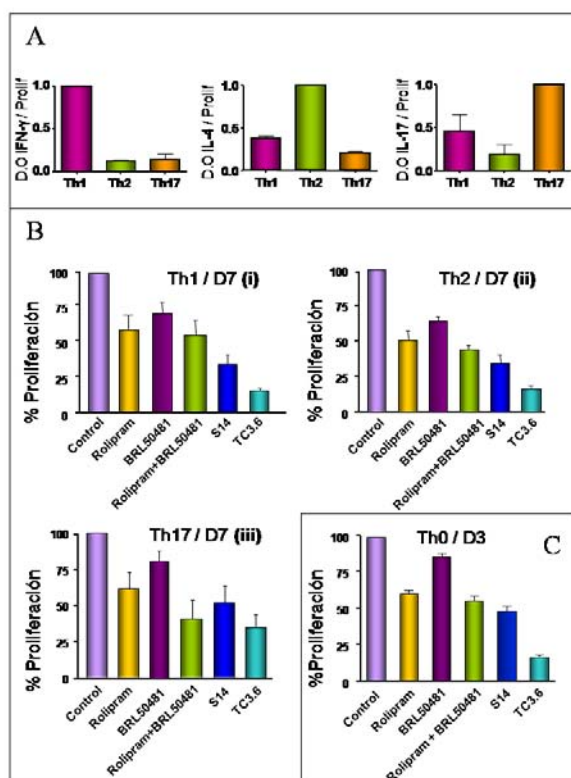


Figura 22. Células CD4⁺ purificadas de bazo de ratón C3H, fueron diferenciadas siguiendo el protocolo de diferenciación establecido para cada fenotipo celular. (A) Después de 7 días de diferenciación se determinaron los niveles de producción de IFN- γ , IL-4 e IL-17, para cada uno de los subtipos celulares mediante ELISA. Los resultados se refirieron al control en cada caso (Th1, Th2 o Th17, para IFN- γ , IL-4 e IL-17 respectivamente). (B y C) Después de 3 (D3) ó 7 días (D7) de diferenciación, las células fueron incubadas con una concentración de 200 μ M de cada uno de los inhibidores de PDE indicados, durante 72h tras las cuales se determinó la proliferación mediante ensayo de MTT. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

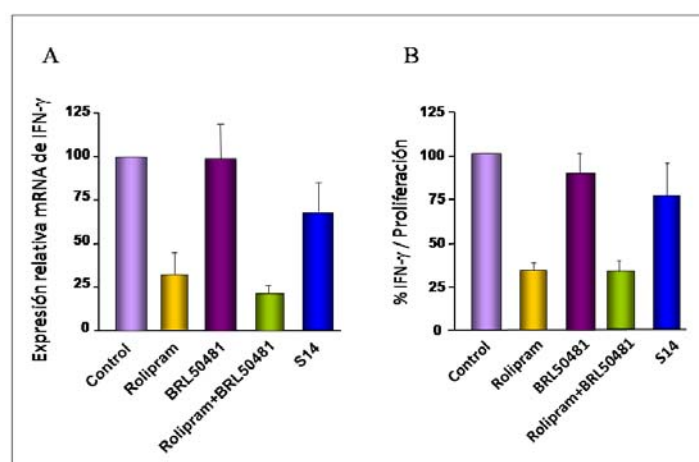


Figura 23. Determinación de IFN- γ en linfocitos Th1. Células CD4⁺ purificadas de bazo de ratón C3H fueron polarizadas hacia el fenotipo Th1 durante 7 días. (A) Niveles de expresión de IFN- γ determinados mediante RT-PCR en tiempo real después de 4h de estímulo con Ionomicina y PMA en presencia o ausencia de los inhibidores de PDEs. (B) Cuantificación por ELISA de los niveles de proteína, tras una segunda ronda de activación de 72h con anti-CD3 fijado a placa en presencia o no de los inhibidores de PDEs. Los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real del gen de IFN- γ fueron referenciados al valor obtenido para el gen *housekeeping* β -actina en cada muestra. Los resultados obtenidos para ELISA, fueron referidos a los niveles de proliferación de cada una de las muestras. La concentración de los inhibidores fue de 200 μ M. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

En el caso de la citoquina anti-inflamatoria IL-4, característica del subtipo celular Th2, se encontró una disminución de sus niveles cuando las células eran cultivadas en condiciones de inhibición de PDE4. Aunque la inhibición de PDE7 por BRL50481 ó S14 produce una ligera disminución de esta citoquina, el efecto es mucho más acusado cuando se inhibe PDE4 (Fig. 24) o cuando se inhiben simultáneamente PDE4 y PDE7.

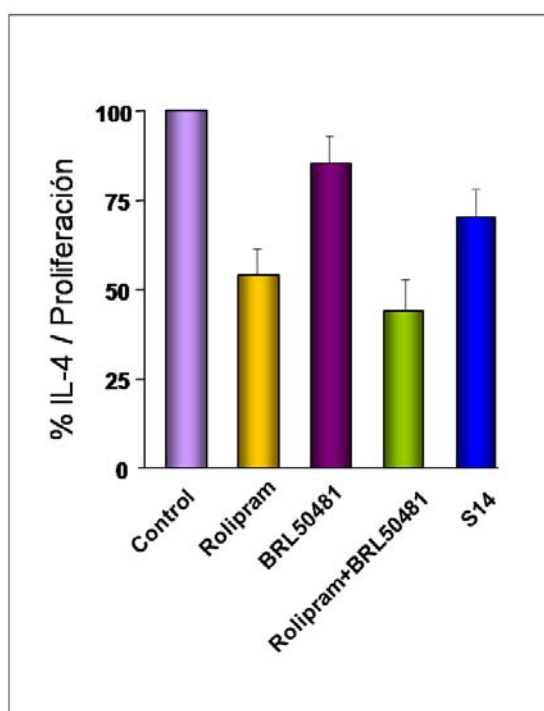


Figura 24. Determinación de IL-4 en linfocitos Th2. Células CD4⁺ purificadas de bazo de ratón C3H fueron diferenciadas hacia el fenotipo Th2 durante 7 días. Tras una segunda ronda de activación de 72h con anti-CD3 fijado a placa e incubadas o no con los inhibidores de PDE, se determinó mediante ELISA la producción de IL-4. Los resultados obtenidos, fueron referidos a los niveles de proliferación celular de cada una de las muestras. La concentración de los inhibidores fue de 200µM. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

Por otra parte, se cuantificó la expresión de IL-17 en células Th17. Como se puede comprobar en la figura 25, y de manera sorprendente, los niveles de IL-17 se ven aumentados en las muestras tratadas con Rolipram, lo cual se observa tanto en niveles de mRNA determinados por RT-PCR en tiempo real, como en niveles de proteína secretada determinados por ELISA. Además, la inhibición de PDE4 y PDE7 de forma simultánea con Rolipram y BRL50418, sinergiza produciendo un mayor aumento de la expresión de esta citoquina. Este aumento de IL-17 no es mediado por la inhibición de PDE7 por sí sola. En el caso del inhibidor dual TC3.6 no se detecta efecto significativo sobre la expresión de IL-17, a pesar de tener actividad de inhibición para PDE4.

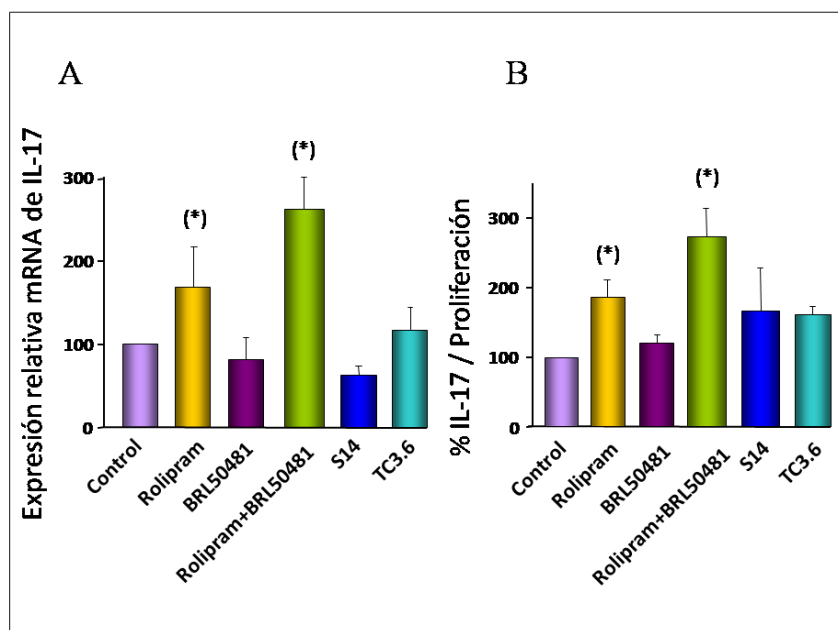


Figura 25. Determinación de IL-17 en linfocitos Th17. Células CD4⁺ purificadas de bazo de ratón C3H fueron sometidas al proceso de diferenciación hacia el fenotipo Th17 durante 7 días. (A) Niveles de expresión de IL-17 determinados mediante RT-PCR en tiempo real después de 4h de estímulo con Ionomicina y PMA en presencia o ausencia de los inhibidores de PDEs. (B) Cuantificación por ELISA de los niveles de proteína, tras una segunda ronda de activación de 72h con anti-CD3 fijado a placa en presencia o no de los inhibidores de PDEs. Los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real del gen de IL-17 fueron referenciados al valor obtenido para el gen housekeeping β -actina en cada muestra. Los resultados obtenidos para ELISA, fueron referidos a los niveles de proliferación de cada una de las muestras. La concentración de los inhibidores fue de 200 μ M llevando la muestra control el DMSO correspondiente a la empleada en las muestras con inhibidores. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

2.2.- EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE PDE4 Y PDE7 *IN VITRO* DURANTE EL PROCESO DE DEFINICIÓN DE FENOTIPO.

Una vez determinado el efecto de la inhibición de PDE4 y PDE7 sobre los tres fenotipos ya definidos de linfocitos Th, quisimos comprobar si dicha inhibición podría influir sobre el proceso de definición de los subtipos celulares. Para comprobar ésto, se llevaron a cabo ensayos de definición de fenotipo en presencia de los distintos inhibidores de PDE (10 μ M). Al cabo de tres o siete días de cultivo se analizó en cada una de las poblaciones resultantes la capacidad de respuesta a estímulo para proliferación y producción de citoquinas.

2.2.1.- Respuesta proliferativa en células T.

En primer lugar, se realizaron ensayos de diferenciación en condiciones de inhibición de PDE4 por Rolipram. Al cabo de siete días de cultivo en condiciones de diferenciación Th0, Th1, Th2 ó Th17, se ensayó la proliferación en respuesta a anti-CD3, sin volver a añadir los inhibidores durante esta segunda ronda de activación.

En el resultado mostrado en la figura 26A se puede comprobar que las muestras que habían sido tratadas con Rolipram en la primera ronda de activación tienen una mayor proliferación en respuesta a la segunda ronda de estimulación. Este aumento de la proliferación celular es un efecto general para las cuatro condiciones de definición de subtipo Th. Puesto que en la segunda ronda de activación en la que analizamos la proliferación celular, ya no está presente el inhibidor de PDE4, se puede concluir que este efecto ha quedado impreso en la población de linfocitos T que ha sido diferenciada en presencia de Rolipram.

Para determinar si este efecto se había producido ya en etapas tempranas del proceso de diferenciación, se recogieron muestras a los tres días de cultivo. El resultado mostró que el aumento de respuesta proliferativa mediado por Rolipram en los distintos subtipos Th ya existe en etapas tempranas del proceso de diferenciación (Fig. 26B).

Pudimos comprobar que el efecto sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T es específicamente ejercido por la inhibición de PDE4, ya que no tiene lugar cuando las células han diferenciado en presencia de BRL50418 ó S14 (Fig. 26C).

Una posibilidad para explicar el aumento de proliferación en los cultivos pretratados con Rolipram, sería el de una disminución en la apoptosis de las células tratadas con el inhibidor de PDE4. La apoptosis juega un papel fundamental en la biología de las células T. A través de este mecanismo, es evitado el exceso de células específicas de antígeno después de la respuesta inmune (apoptosis derivada de activación del TCR), para mantener la homeostasis en tejidos periféricos. Por lo que una disminución en la apoptosis conllevaría un aumento de la proliferación celular.

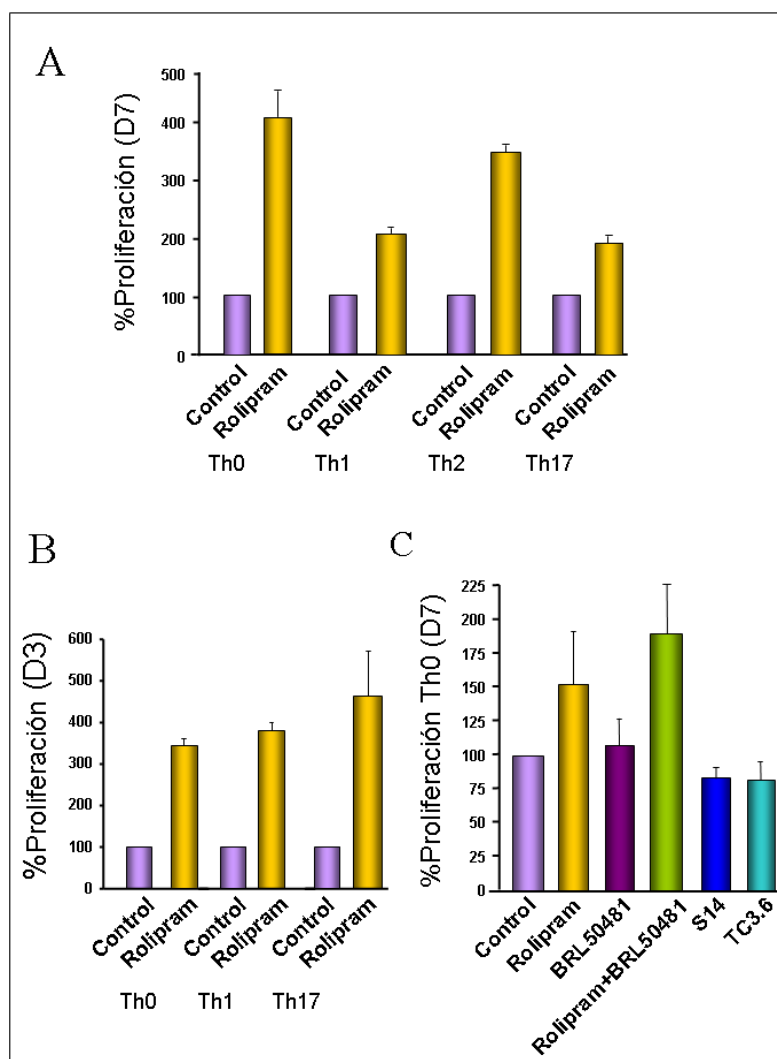


Figura 26. Proliferación de células diferenciadas en presencia de inhibidores de PDE. Células $CD4^+$ purificadas de bazo de ratón C3H fueron sometidas durante 3 ó 7 días, al proceso de diferenciación hacia los distintos fenotipos de células Th (Th0, Th1, Th2 y Th17) en presencia o no de una concentración de $10\mu M$ de Rolipram. Después de 3 (B) ó 7 (A) días fueron cultivadas 72h en presencia de anti-CD3 fijado a placa pero en ausencia de los inhibidores de PDE. (C) Células $CD4^+$ *naïve* fueron diferenciadas en presencia o ausencia de $10\mu M$ de los inhibidores de PDE4 y PDE7 indicados en la figura, durante 7 días hacia el fenotipo Th0. Posteriormente fue determinada su proliferación 72h después de la segunda ronda de activación con anti-CD3 fijado a placa y en ausencia de inhibidores. La proliferación celular de cada una de las muestras, fue determinada mediante ensayo colorimétrico con MTT. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

Para determinar si Rolipram protege de la apoptosis derivada de la activación celular, se realizaron ensayos de tinción con Anexina-V-FITC de células que habían sido activadas vía TCR con anti-CD3. Como se observa en la figura 27A, el porcentaje de células en apoptosis disminuyó en la población total de bazo hasta un 60% cuando la

activación celular se había llevado a cabo en presencia de Rolipram. Además, si de este cultivo total observamos la apoptosis de células $CD4^+$ por una parte, y de células $CD4^-$ por otra (Fig. 27B), podemos comprobar que el efecto de protección está afectando principalmente a la población $CD4^+$ donde disminuye en un 70% el porcentaje de células en apoptosis.

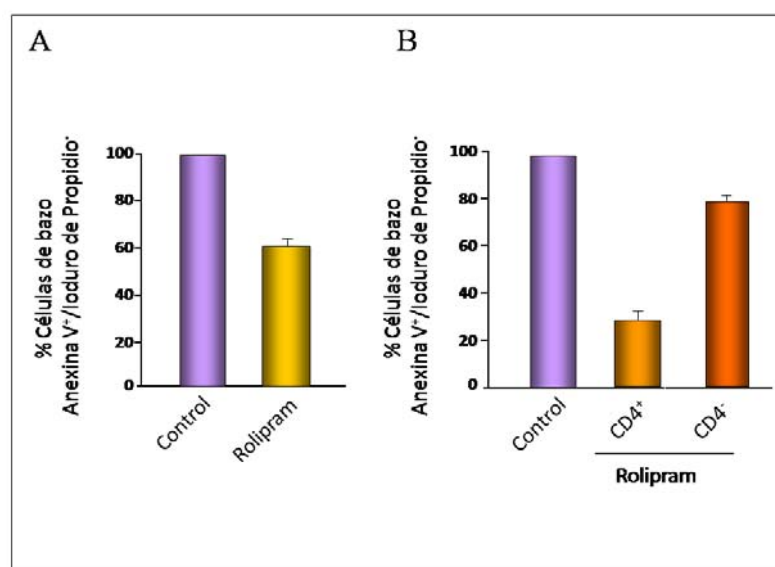


Figura 27. Porcentaje de células Annexina V⁺ tras el tratamiento con Rolipram. Células totales de bazo de ratón C3H fueron activadas 48h con anti-CD3 fijado a placa en presencia o ausencia de Rolipram. Se realizó tinción con Annexina V y Ioduro de Propidio para determinar el porcentaje de células en apoptosis temprana mediante citometría de flujo, seleccionando aquellas que eran Annexina V⁺ Ioduro de Propidio⁺. La concentración empleada de Rolipram fue de 10 μ M. En el panel A se analizó la población total de bazo y en el panel B se analizaron por separado las poblaciones $CD4^+$ y $CD4^-$. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

2.2.2.- Producción de citoquinas en células T.

Por otra parte, se analizó la producción de citoquinas características de cada fenotipo celular en los cultivos que habían diferenciado bajo inhibición de PDE. En el caso de IFN- γ , se pudo comprobar que ni la inhibición de PDE4 ni la de PDE7 por sí solas producían cambios significativos en los niveles de esta citoquina, ni en cuanto a los niveles de mRNA, ni en cuanto a la citoquina total secretada al medio extracelular. Sin embargo, tras la inhibición simultánea de ambas PDEs, los niveles de IFN- γ se ven disminuidos sensiblemente (Fig. 28). En este caso, la utilización del inhibidor dual TC3.6 sí mostró un efecto similar a la combinación de Rolipram y BRL50481.

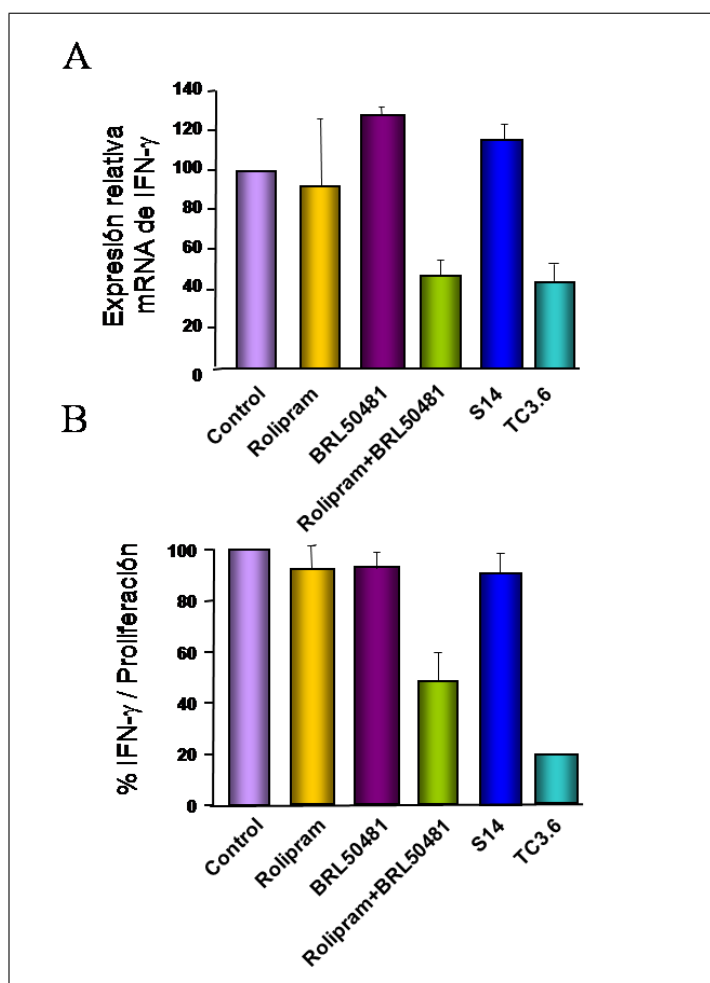


Figura 28. Producción de IFN- γ en células Th1 diferenciadas en presencia de inhibidores de PDE. Células CD4⁺ purificadas de bazo de ratón C3H fueron sometidas al proceso de diferenciación hacia el fenotipo Th1 durante 7 días en presencia de los inhibidores de PDE4 y PDE7 indicados. (A) Niveles de expresión de IFN- γ determinados mediante RT-PCR en tiempo real después de 4h de estímulo con Ionomicina y PMA, en ausencia de inhibidores y referenciados al valor obtenido para el gen *housekeeping* β -actina en cada muestra. (B) Cuantificación por ELISA de los niveles de proteína en los sobrenadantes de células Th1, tras una segunda ronda de activación de 72h con anti-CD3 fijado a placa, en ausencia de inhibidores y referidos a los niveles de proliferación de cada una de las muestras. La concentración de los inhibidores durante diferenciación fue de 10 μ M, mientras que en la segunda ronda de activación no estuvieron presentes estos inhibidores. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

En la figura 29, se observa que los niveles de IL-4 únicamente disminuyen tras el tratamiento con Rolipram durante el proceso de diferenciación. TC3.6 no es lo suficientemente potente para ejercer el mismo efecto que Rolipram sobre la expresión de IL-4. La disminución de la producción de IL-4 mediada por Rolipram tiene lugar tanto a nivel de mRNA como de secreción de esta citoquina.

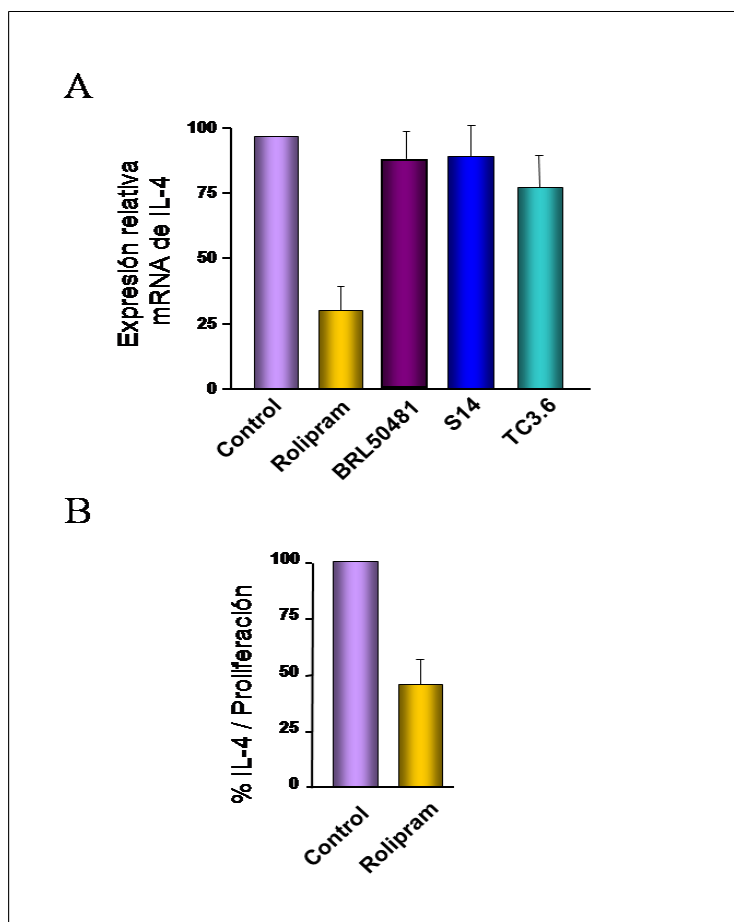


Figura 29. Producción de IL-4 en células Th2 diferenciadas en presencia de inhibidores de PDE. CD4⁺ purificadas de bazo de ratón C3H fueron polarizadas hacia el fenotipo Th2 durante 7 días en presencia de los inhibidores de PDE4 y PDE7 indicados. (A) Niveles de expresión de IL-4 determinados por RT-PCR en tiempo real tras de 4h de estímulo con Ionomicina y PMA, en ausencia de inhibidores. (B) ELISA de los sobrenadantes de células Th2, tras una segunda ronda de activación de 72h con anti-CD3 fijado a placa, en ausencia de inhibidores. Los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real del gen de IL-4 fueron referenciados al valor obtenido para el gen *housekeeping* β -actina en cada muestra. Los resultados obtenidos para ELISA, fueron referidos a los niveles de proliferación de cada una de las muestras. La concentración de los inhibidores durante diferenciación fue de 10 μ M, mientras que en la segunda ronda de activación no estuvieron presentes estos inhibidores. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

Cuando se analizó la expresión de IL-17 en células que habían sido sometidas a presión de diferenciación hacia Th17, se observó un aumento de los niveles de expresión de esta citoquina en las muestras que habían sido diferenciadas en condiciones de inhibición de PDE4 por Rolipram, a pesar de que dicho inhibidor no estuvo presente durante la segunda ronda de activación en respuesta a la cual se mide la producción de IL-17 (Fig. 30A). Dicho aumento es detectable tanto en los niveles de mRNA como en

los niveles de proteína secretada (Fig. 30Ai y 30Aii). Si la definición de fenotipo Th se lleva a cabo en presencia de Rolipram y BRL50481 simultáneamente, la inhibición de ambas PDE produce un efecto sinérgico en el aumento de esta citoquina.

Para comprobar si Rolipram tenía capacidad para desviar el fenotipo Th hacia Th17 aún en ausencia de las citoquinas que dirigen este fenotipo (TGF β e IL-6), analizamos la producción de IL-17 en cultivos que habían sido diferenciados en condición Th0 en presencia de Rolipram. En la figura 30B se puede comprobar que también en este caso la inhibición de PDE4 lleva a un aumento de la capacidad de producción de IL-17, mientras que la inhibición de PDE7 no afecta a este proceso. Para determinar si este efecto era producido en etapas tempranas del proceso de diferenciación, realizamos los mismos ensayos en células que habían sido diferenciadas durante 3 días, observando de nuevo un aumento de IL-17, tanto en el fenotipo Th17 (Fig. 30Ci) como en Th0 (Fig. 30Cii).

Para determinar si el aumento de IL-17 está producido por un aumento de la expresión de la citoquina o por un mayor número de células productoras de la misma, se realizaron ensayos de tinción intracelular. Las células diferenciadas durante 7 días hacia Th17 ó Th0, en presencia de los inhibidores, fueron estimuladas durante 5 horas con Ionomicina y PMA, y se cuantificó el número de células productoras de IL-17 mediante citometría de flujo (Fig. 31Ai y 31Aii). En la figura 31Ai se observa un aumento en el porcentaje de células Th17 productoras de IL-17 en los cultivos que han sido diferenciados en presencia de Rolipram. Este aumento en el número de células IL-17 positivas, también se pudo observar en el cultivo diferenciado en condiciones Th0 (Fig. 31Aii).

Ya que la producción de IL-17 se había visto aumentada en etapas tempranas de la diferenciación, se determinó el porcentaje de células IL-17 positivas a D3. En este caso también se pudo observar un aumento del porcentaje de células productoras de IL-17 (Fig. 31B), lo que indica que el efecto producido por Rolipram para desviar el fenotipo Th a Th17, es ejercido ya en etapas tempranas de la diferenciación.

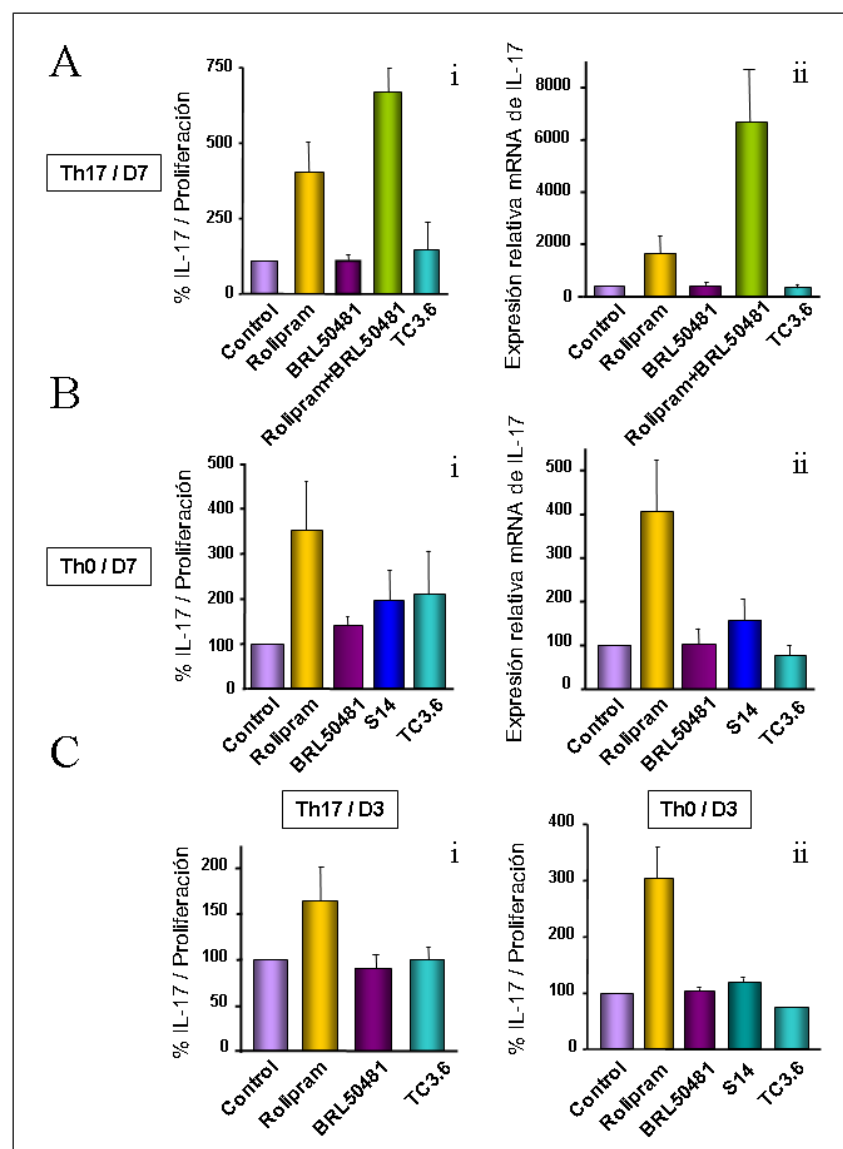


Figura 30. Producción de IL-17 en células Th17 y Th0 diferenciadas en presencia de inhibidores de PDE. $CD4^+$ purificadas de bazo de ratón C3H fueron sometidas al proceso de diferenciación hacia el fenotipo Th17 (A y Ci) o Th0 (B y Cii), durante 3 (C) ó 7 días (A y B). Tras este periodo de tiempo fueron estimuladas 72h con anti-CD3 fijado a placa y analizada la producción de IL-17 por ELISA (Ai, Bi, Ci y Cii) o activadas 4h con Ionomicina y PMA y determinada la expresión de dicha citoquina mediante RT-PCR en tiempo real (Aii y Bii). Los resultados obtenidos para ELISA, y para RT-PCR en tiempo real del gen de IL-17 fueron referenciados como se explica en las figuras anteriores. La concentración de inhibidores empleada durante la diferenciación fue de $10\mu M$ mientras que en la segunda ronda de activación no estuvieron presentes estos inhibidores de PDE. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

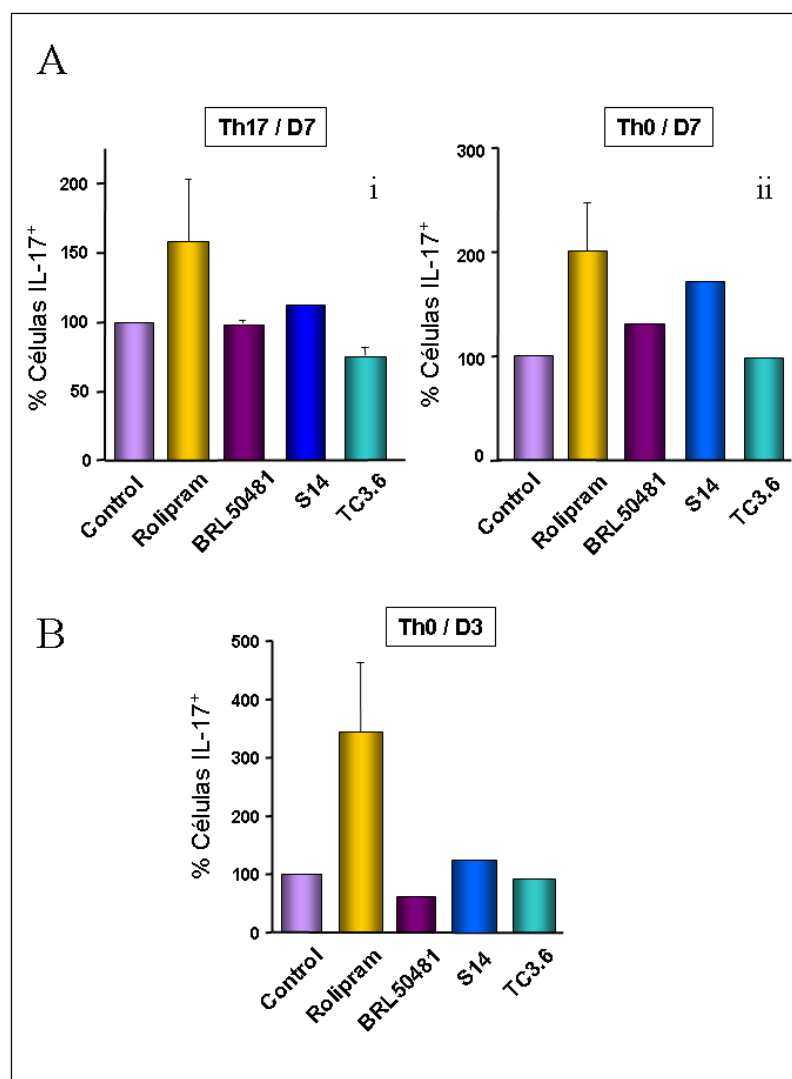


Figura 31. Determinación de células productoras de IL-17 en cultivos diferenciados en presencia de inhibidores de PDE. $CD4^+$ purificadas de bazo de ratón C3H fueron sometidas al proceso de diferenciación hacia el fenotipo Th17 (Ai) o Th0 (Aii y B), durante 7 (A) ó 3 días (B). Tras este periodo de tiempo fueron estimuladas 5h con Ionomicina y PMA y determinado el porcentaje de células productoras de IL-17 mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo de tinción intracelular de interleuquinas (Apartado 13 de Materiales y Métodos). La concentración de inhibidores empleada durante la diferenciación fue de $10\mu\text{M}$ mientras que en la segunda ronda de activación no estuvieron presentes estos inhibidores de PDE. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

2.2.3.- Respuesta proliferativa y producción de IL-17 en células de bazo total.

Debido al aumento producido por la inhibición de PDE4 (por Rolipram), en la proliferación celular y en los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-17, en linfocitos Th (Figs. 26, 30 y 31), quisimos determinar si este efecto tiene consecuencias en una población total de bazo. Para ello, llevamos a cabo ensayos de diferenciación de células

totales de bazo hacia el fenotipo Sc0 (*Spleen cells* subtipo 0) siguiendo el mismo protocolo que para T0. Bajo estas condiciones, no se detectó un aumento de proliferación celular mediada por la inhibición de PDE4; muy al contrario la proliferación fue disminuida por todos los inhibidores ensayados (Fig. 32A). Además no hubo aumento en la producción de IL-17 (Fig. 32B) que fue inhibida por la combinación de Rolipram y BRL50481. Estos resultados sugieren que, el aumento en la proliferación y en la producción de IL-17 por Rolipram son producidos específicamente sobre células CD4⁺ y que son enmascarados debido a la presencia de otros tipos celulares en bazo.

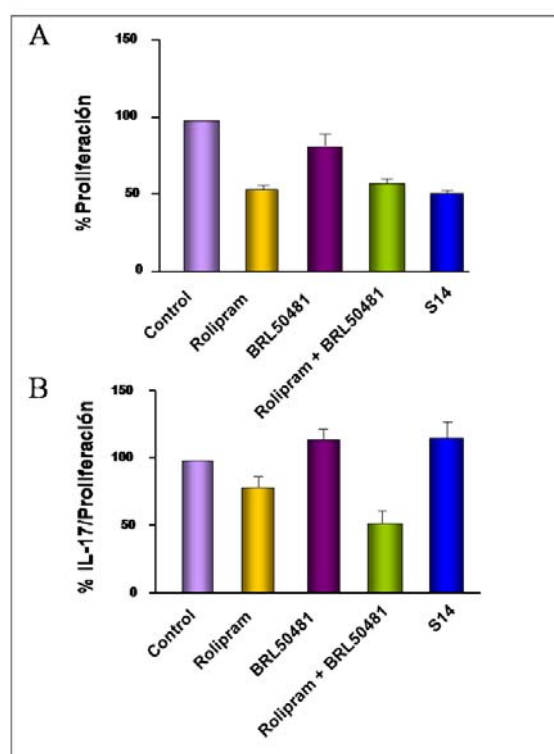


Figura 32. Proliferación y producción de IL-17 en células de bazo total diferenciadas hacia Sc0 en presencia de inhibidores de PDE durante 3 días. (A) Después de 3 días y tras una segunda ronda de activación con anti-CD3 durante 72h, se determinó la proliferación celular mediante MTT. (B) Cuantificación por ELISA de los niveles de IL-17. La concentración de inhibidores empleada durante la diferenciación fue de 10μM. En la segunda ronda de activación no estuvieron presentes estos inhibidores de PDE. Los resultados obtenidos para la producción de IL-17 fueron referidos a los niveles de proliferación celular de cada una de las muestras. Este experimento representa la media de dos experimentos independientes. Los resultados fueron referidos en cada caso al control sin inhibidor (100%).

2.3.- TRATAMIENTO *IN VIVO* CON INHIBIDORES DE PDE4 Y PDE7.

Desde hace años, se han descrito efectos beneficiosos de la inhibición de PDE4, sobre enfermedades como la EM y su modelo animal (Navikas *et al.*, 1998; Folcik *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2006), aunque este efecto había sido analizado más a fondo en modelos de rata. Nuestro grupo, en colaboración con el del Dr. Antonio García Merino (Hospital Puerta de Hierro), había comprobado efectos beneficiosos de Rolipram en ratas Lewis (Sanchez *et al.*, 2005). Sin embargo, los datos obtenidos *in vitro* en células de ratón que acabamos de describir, en los que Rolipram inhibe la apoptosis de células T y favorece el establecimiento del fenotipo proinflamatorio Th17, podían hacer

pensar que este inhibidor de PDE4 careciese de efecto terapéutico en modelos de EAE murina.

Para comprobarlo, llevamos a cabo tratamientos *in vivo* con los inhibidores de PDE en el modelo de EAE-MBP en ratones SJL. El tratamiento se realizó con los inhibidores comerciales de PDE4 (Rolipram) y PDE7 (BRL50481). El tratamiento fue administrado diariamente por inyección intraperitoneal, desde el momento de inoculación de MBP. Los grupos de animales fueron los siguientes:

- Grupo Control: a los que se les inoculó únicamente adyuvante completo de Freund (CFA).
- Grupo EAE: a los que se inoculó MBP junto con CFA.
- Grupo Rolipram: a los que se inoculó MBP junto con CFA y se les administró Rolipram a diario.
- Grupo BRL5048: a los que se inoculó MBP junto con CFA y se les administró BRL50481 a diario.

2.3.1.- Grado sintomático de EAE.

En la figura 33 se presenta la evolución del cuadro sintomático presentado por los grupos de animales durante los 21 días pi. Los valores de grado de enfermedad mostrados, se obtuvieron aplicando una escala de puntuación clínica de la disfunción motora presentada por el animal diariamente. (Ver sección 16 de Materiales y Métodos). Los resultados muestran que los primeros síntomas de la enfermedad aparecen a partir del día 7-9 del ensayo. Se comprobó que Rolipram disminuye el grado sintomático, y que esta disminución es especialmente evidente en los días de máximo grado de la enfermedad para el grupo control (D17-19). Mientras que los ratones EAE alcanzan un grado aproximado de 3 en la fase aguda de la enfermedad (Fig. 33), el tratamiento con Rolipram hace que los ratones tratados apenas superen el grado 1 (pérdida de tono en la cola). Sin embargo, el tratamiento con BRL50481, inhibidor de PDE7, no tuvo ningún efecto terapéutico.

Dado que, en algunos de los parámetros analizados *in vitro*, la inhibición simultánea de PDE7 y PDE4 había mostrado un efecto superior al ejercido por la inhibición de PDE4 por sí sola, realizamos experimentos de inducción de EAE en los que se incorporó un grupo de animales a los que se trataba simultáneamente con Rolipram y

BRL50481. En los animales en que se utilizó la combinación de ambos inhibidores se evitó casi por completo la aparición de síntomas. Esto indica que podría existir un efecto sinérgico de ambos inhibidores en la mejora de la enfermedad (Fig. 34).

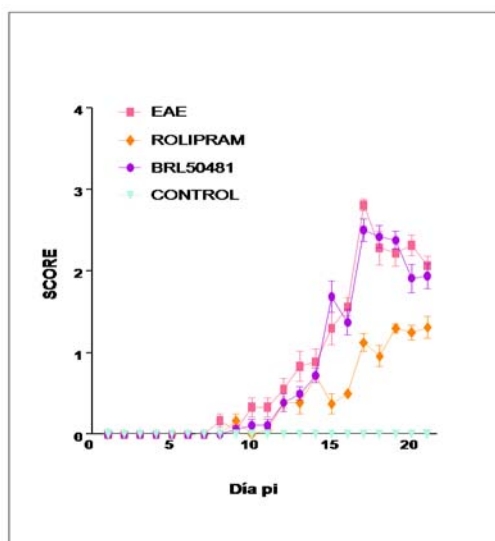


Figura 33. Efecto de la inhibición de PDE4 o PDE7 sobre la inducción activa de EAE-MBP en ratones SJL. El grupo Control fue inmunizado con CFA y PBS; el grupo EAE con MBP y CFA; a los grupos Rolipram y BRL50481, además de MBP y CFA, se les suministró diariamente por vía intraperitoneal cada tratamiento a 5mg/Kg. Se muestra el resultado de un experimento representativo, donde se representa la media de los valores del grado de enfermedad asignados a cada ratón de cada grupo por tres observadores independientes.

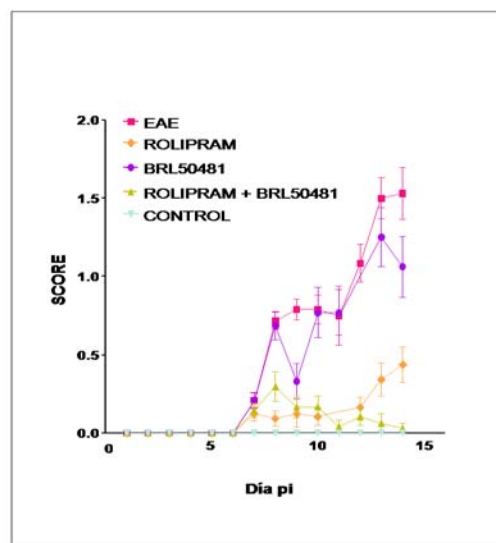


Figura 34. Efecto de la inhibición simultánea de PDE4 y PDE7 sobre la inducción activa de EAE-MBP en ratones SJL. Los grupos representados son similares a la figura anterior a excepción del tratamiento simultáneo con ambos inhibidores donde la administración intraperitoneal diaria fue de 2,5mg/Kg de cada uno de ellos. Se muestra el resultado de un experimento representativo, donde se representa la media de los valores del grado de enfermedad asignados a cada ratón de cada grupo por tres observadores independientes.

2.3.2.- Proliferación y producción de IL-17.

Con la finalidad de determinar la proliferación celular y la producción de IL-17 en células T de cada uno de los grupos, los animales fueron sacrificados al inicio de la enfermedad, durante la fase aguda y crónica del curso de la misma (D8, D14 y D21, respectivamente).

A D8 del curso de la enfermedad, momento inicial de desarrollo de los síntomas, se vio un ligero aumento de proliferación en células CD4⁺ en los animales tratados con Rolipram (Fig. 35A). Sin embargo, tanto a D14 como a D21 no hubo diferencias significativas de proliferación entre los distintos grupos (Figs. 35B y 35C).

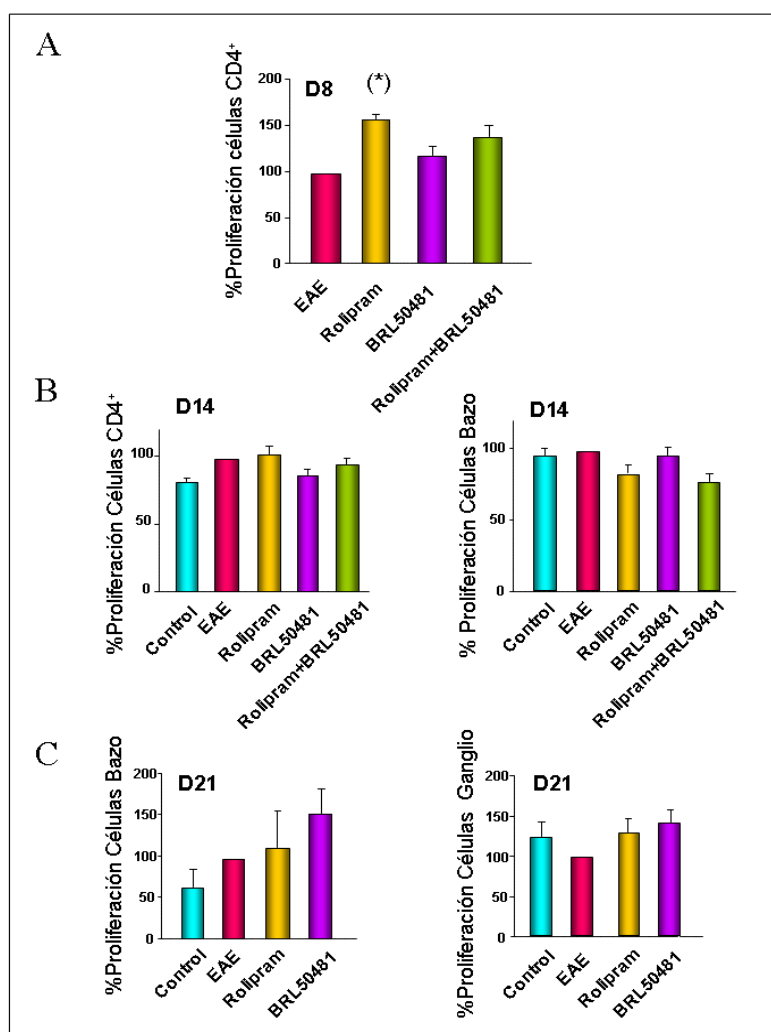


Figura 35. Proliferación celular de las muestras obtenidas de cada grupo de animales después de ser sacrificados a D8 (A), D14 (B) y D21 (C) pi. Las muestras corresponden a los grupos de ratones en los que se indujo o no EAE y los distintos tratamientos que se indican. Células de órganos periféricos de cada uno de los grupos, fueron extraídas y activadas durante 72h con anti-CD3 o Ionomicina y PMA en el caso de no ser detectados los niveles de proliferación con anti-CD3 (D21 Ganglio). Posterior a la activación se llevó a cabo el análisis de la proliferación obtenida por MTT en cada una de las muestras de los distintos grupos. Los datos de cada uno de los paneles están referenciados al grupo EAE.

En la figura 36A se muestra la producción de IL-17 en células CD4⁺ purificadas de bazo de animales sacrificados a D8 pi, donde se puede observar un aumento de la citoquina en los animales tratados con cualquiera de los inhibidores de PDE. Para comprobar si esta mayor producción de IL-17 desaparecía cuando las células CD4⁺ están bajo la posible influencia de otros tipos celulares como ocurre *in vitro* (Fig. 32), cuantificamos la producción de IL-17 en la población total de ganglio (Fig. 36B). Como se puede observar, la producción neta y los niveles de mRNA de IL-17 en una población

heterogénea que no solo contiene células $CD4^+$ también es superior en las muestras procedentes de animales tratados con inhibidores de PDE hasta D8.

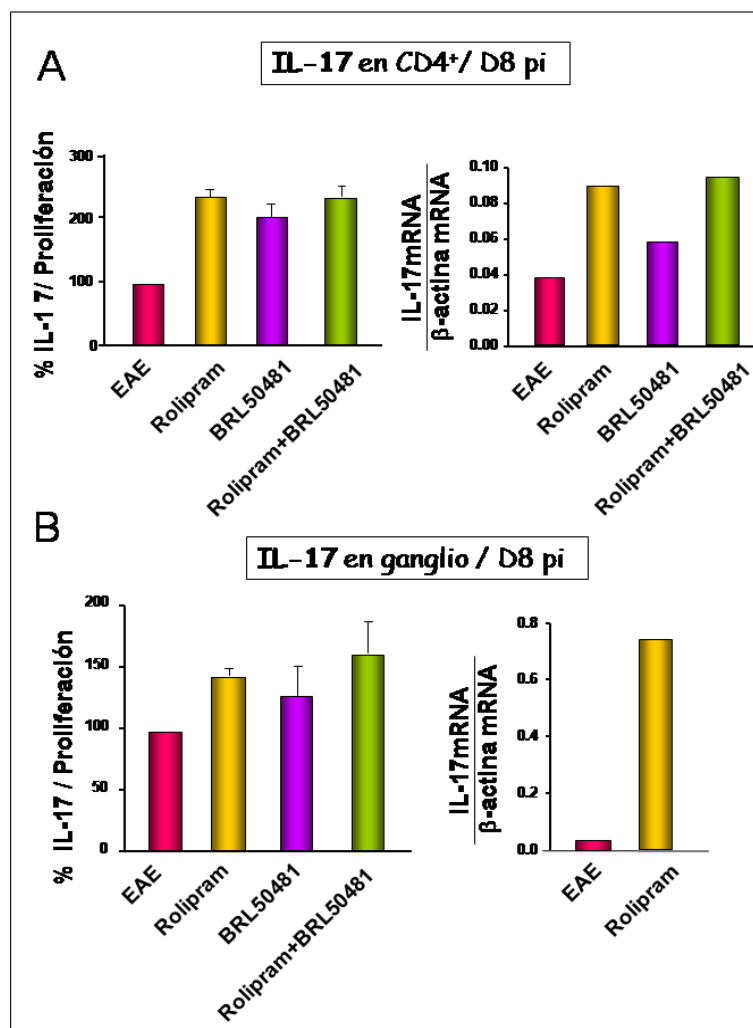


Figura 36. Efecto de la inhibición de PDEs *in vivo* sobre la expresión de IL-17 en órganos periféricos de ratones sacrificados a día 8 pi. Los niveles de IL-17 fueron determinados en células $CD4^+$ purificadas de bazo (A) y en ganglio total (B), mediante ELISA y RT-PCR en tiempo real. Los valores de ELISA fueron referidos a los niveles de proliferación de cada una de las muestras, tomando como control de producción de IL-17 el grupo EAE y los valores de IL-17 obtenidos por RT-PCR en tiempo real fueron referenciados al valor obtenido para β -actina en cada muestra.

Sin embargo, los resultados obtenidos para los niveles de IL-17 producidos por células de ganglio o de bazo procedentes de animales sacrificados a D14 pi, a diferencia de los resultados obtenidos a D8 pi, mostraron una disminución de esta citoquina proinflamatoria, debida al tratamiento con Rolipram (Fig. 37).

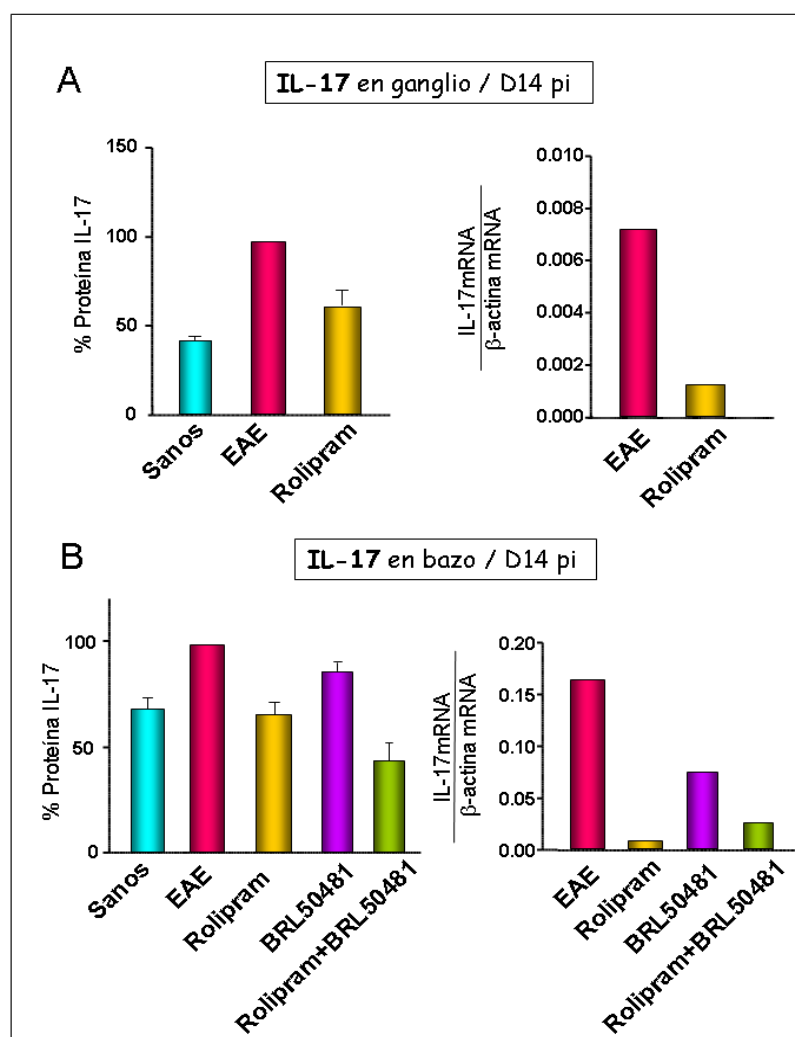


Figura 37. Efecto de la inhibición de PDE *in vivo* sobre la expresión de IL-17 en órganos periféricos, ganglio (A) y bazo (B) a día 14 pi. Mediante ELISA de los sobrenadantes de los ensayos de proliferación, se determinó la producción de IL-17 en ganglio y bazo. Tras la extracción de RNA de las muestras, se llevaron a cabo las RT-PCRs en tiempo real, y los valores de IL-17 obtenidos fueron referenciados al valor obtenido para el gen *housekeeping* β -actina en cada muestra. Los valores de ELISA fueron referidos a los niveles de proliferación de cada una de las muestras, tomando como control de producción de IL-17 el grupo EAE.

Esta disminución en la producción de IL-17 en células de animales tratados con el inhibidor de PDE4 se mantuvo a D21 pi., mientras que la inhibición de PDE7 con BRL50481 no afectó significativamente a los niveles de IL-17 respecto al grupo de animales no tratados (Fig. 38).

Estos datos indican que, aunque en las primeras etapas de desarrollo de la EAE Rolipram provoca un aumento en la producción de IL-17 respecto a los animales EAE, en etapas posteriores estos niveles son revertidos de forma que en el grupo tratado con

Rolipram, o con la combinación de Rolipram y BRL50481, la producción de IL-17 en órganos periféricos es inferior que en el grupo EAE. Para comprobar si esta disminución también sucede en SNC, se extrajo RNA de médula espinal de animales, a D14 pi y se analizó por RT-PCR en tiempo real el nivel de expresión de IL-17. Como se aprecia en la figura 39, los datos obtenidos en SNC correlacionan con los datos obtenidos en periferia, es decir, el tratamiento con Rolipram conduce a una menor expresión de IL-17 tanto en periferia como en SNC.

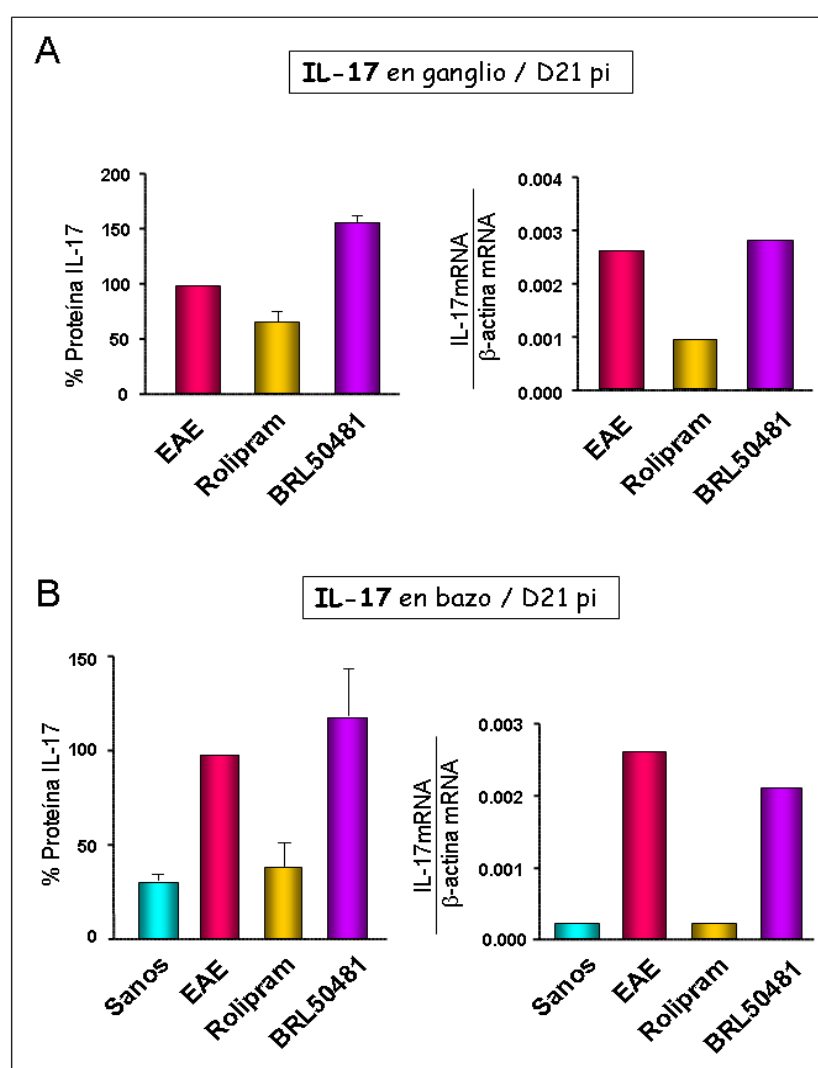


Figura 38. Efecto de la inhibición de PDE *in vivo* sobre la expresión de IL-17 en órganos periféricos, ganglio (A) y bazo (B) a día 21 pi. Mediante ELISA de células de ganglio y bazo, se determinó la producción de IL-17, de los distintos grupos de animales. Tras la extracción de RNA de las muestras, se llevaron a cabo las RT-PCRs en tiempo real y los valores de IL-17 fueron referenciados al valor obtenido para el gen *housekeeping* β -actina en cada muestra. Los valores de ELISA fueron referidos a porcentaje de producción de IL-17 tomando como control de producción el grupo EAE.

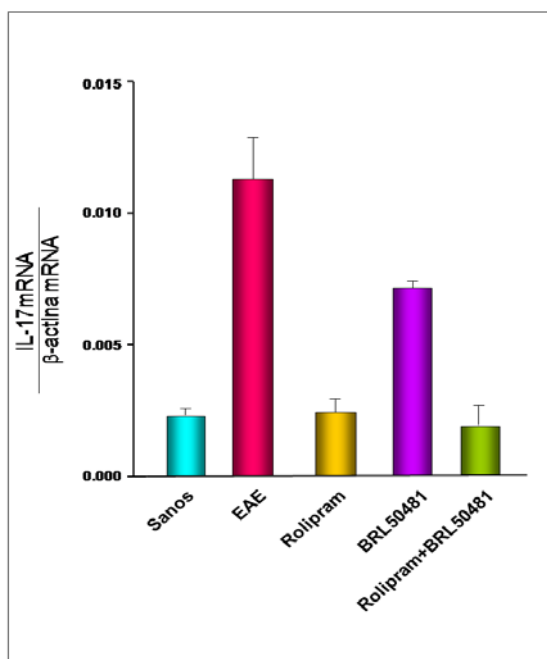


Figura 39. Efecto de la inhibición de PDE *in vivo* sobre la expresión de IL-17 en sistema nervioso central (SNC) de ratones sacrificados a D14 pi. Las muestras de SNC analizadas por RT-PCR en tiempo real fueron tomadas de los distintos grupos de animales que se indican el pie de figura. Tras la extracción de las médulas y su posterior congelación, se extrajo el RNA de las mismas como se indica en el apartado 14 de Mat y Met. Los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real del gen de IL-17 fueron referenciados al valor obtenido para β-Actina en cada muestra.

2.3.3.- Procesos relacionados con el control de la actividad de IL-17.

Del hecho de que las células de animales sacrificados a D8 expresaran unos mayores niveles de IL-17 en los grupos tratados con Rolipram o con la combinación de Rolipram y BRL50481, cabría esperar que dichas células tuviesen mayores propiedades proinflamatorias que las de los animales sin tratar, lo cual no correlacionaría con la posterior atenuación de síntomas clínicos. Por ello, nos planteamos la posibilidad de que algún factor o factores ejerciesen un control sobre los efectos proinflamatorios de IL-17.

2.3.3.1.- IL-10.

Es sabido que la citoquina anti-inflamatoria IL-10 es un factor importante durante el proceso de remisión de la EAE. Además, en los últimos años se ha descrito que células que producen simultáneamente IL-17 e IL-10 poseen un fenotipo no inflamatorio (McGeachy *et al.*, 2007). Por esta razón, analizamos las muestras de D8 p.i. para determinar los niveles de IL-10.

En este análisis se comprobó que el inhibidor de PDE4, Rolipram, es capaz de aumentar los niveles de producción (Fig. 40A) y de transcripción (Fig. 40B) de esta citoquina anti-inflamatoria tanto en células CD4⁺ purificadas como en poblaciones celulares totales de bazo y ganglio (Fig. 40). Esto podría estar ejerciendo un efecto beneficioso en la disminución de los síntomas de la enfermedad.

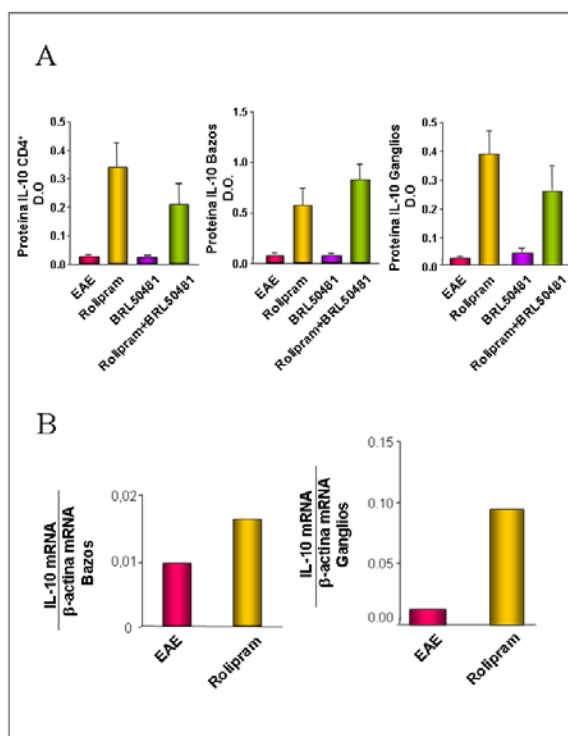


Figura 40. Efecto de la inhibición de PDE *in vivo* sobre la expresión de IL-10 en periferia, en ratones sacrificados a D8 p.i. (A) Mediante ELISA de los sobrenadantes de los ensayos de proliferación, se determinó la producción de IL-10 de las muestras sin estimular. (B) Las muestras analizadas por RT-PCR en tiempo real corresponden, a un “pool” de células recién obtenidas de bazo y ganglio de cada uno de los ratones de los diferentes grupos que se indican en cada pie de figura. Posterior a la extracción de RNA de las muestras sin estimular se realizaron las RT-PCRs en tiempo real. Los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real del gen de IL-10 fueron referenciados al valor obtenido para β-actina en cada muestra.

2.3.3.2.- Foxp3.

También quisimos analizar la expresión de Foxp3 como marcador de la presencia de células nTreg en los distintos grupos de animales. La cuantificación de este factor de transcripción se realizó por RT-PCR en tiempo real en células de ganglio o CD4⁺ purificadas de bazo de los distintos grupos de animales. Los resultados de la figura 41A muestran un aumento de Foxp3 en los animales tratados con Rolipram y sacrificados a D8. Este aumento de expresión característico de células reguladoras, podría estar afectando de manera positiva disminuyendo los síntomas de la enfermedad.

Quisimos ver si este efecto permanecía a lo largo del tiempo, para lo que se analizaron las muestras de animales sacrificados a D14 y D21, en los cuales las diferencias entre el grupo tratado con Rolipram y los grupos EAE y BRL50481 son incluso más acusadas que a D8, correlacionando con una menor expresión de IL-17 (Fig. 41B).

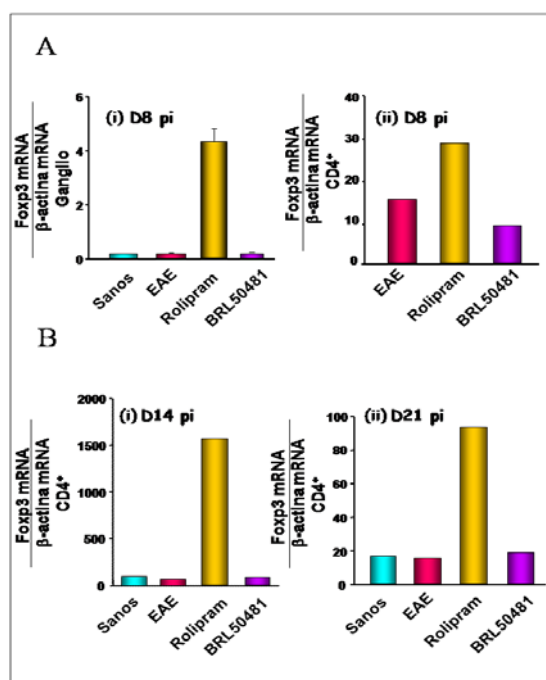


Figura 41. Efecto de la inhibición de PDE *in vivo* sobre células reguladoras. Las muestras analizadas por RT-PCR en tiempo real corresponden, a los grupos de ratones que se indican en cada gráfico. El RNA de cada uno de los grupos fue extraído de ganglio (Ai) o de células CD4⁺ purificadas de bazo de los ratones sacrificados a D8 pi (Aii), D14 pi (Bi), ó D21 pi (Bii). Las células fueron procesadas inmediatamente (A y Bi) o mantenidas en cultivo 4h sin estímulo (Bii). Los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real del gen de Fosp3 fueron referenciados al valor obtenido para el gen *housekeeping* β -actina en cada muestra.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo se ha centrado principalmente en el estudio de los mecanismos por los cuales IFN β e inhibidores de PDE ejercen su efecto terapéutico en inflamación. Para ello, se han analizado los efectos de estos fármacos *in vitro*, tanto en linfocitos Th de fenotipo ya establecido [clon Th2 (D10.G4.1) o células diferenciadas hacia los fenotipos Th1, Th2 y Th17], como durante el proceso de definición de fenotipo de células T *naïve* hacia Th1, Th2 y Th17. Por otra parte, además de los efectos analizados *in vitro*, se ha realizado el estudio *in vivo* del impacto de estos tratamientos en un modelo de EAE inducida por MBP en ratones SJL.

La utilización de IFN β es por el momento una de las principales terapias empleadas en EM. Parece que su función terapéutica viene determinada por sus propiedades anti-inflamatorias; sin embargo, los mecanismos concretos a través de los que ejerce su acción no son completamente conocidos. Algunos resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado una disminución y retraso en los síntomas clínicos en el modelo animal de EAE-MBP, junto con una disminución de los infiltrados perivasculares tras el tratamiento con IFN β (Martin-Saavedra *et al.*, 2007). Aquí describimos dos resultados que podrían estar implicados en dicho efecto terapéutico, como son el control negativo sobre la expresión de IL-17 y el papel de protección frente a apoptosis en células nTreg.

Aunque se ha propuesto que la señalización de IFN tipo I endógeno influye negativamente en la expresión de IL-17 a través de la producción de IL-27 por macrófagos y células dendríticas durante la respuesta inmune innata (Guo *et al.*, 2008), nosotros hemos encontrado una disminución de la expresión de IL-17 mediada por IFN β en cultivos *in vitro* de células CD4⁺ aisladas (Fig 13). Esto demuestra que la disminución de IL-17 observada, es un efecto directo del fármaco sobre linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, si en el cultivo de linfocitos T CD4⁺ totales, son eliminadas las células CD25⁺, los niveles de mRNA de IL-17 no se ven alterados tras el tratamiento con IFN β , lo que sugiere que la disminución que provoca IFN β en la expresión de IL-17 está mediada por células nTreg presentes en la población total de células T CD4⁺. Por lo tanto, además de la regulación a través de la respuesta innata propuesta por Guo *et al.* (2008), IFN β podría modular la expresión de IL-17 a través de una respuesta de memoria en la que estarían implicadas las células nTreg. De hecho, encontramos un aumento en el número de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y un retraso en la disminución de la expresión de mRNA de Foxp3 en la población de células CD4⁺ incubadas con IFN β .

(Fig. 11). Por otra parte, la función supresora de una población de células $CD4^+$ preactivada con anti-CD3 fijado, fue significativamente aumentada por el tratamiento con $IFN\beta$ (Fig. 10A). La disminución en células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ y el decaimiento de mRNA de *Foxp3* observado en los cultivos control de la figura 11, están de acuerdo con la tendencia de células nTreg a apoptosis espontánea en cultivo (Taams *et al.*, 2001). El tratamiento con $IFN\beta$ confiere una resistencia a este tipo celular frente a apoptosis, sugiriendo que este fármaco actúa como factor de supervivencia de células nTreg. En concordancia con estos resultados, otros autores han encontrado una resistencia a apoptosis en células $CD4^+CD25^+$ humanas en medio condicionado de fibroblastos (FCM), que es una fuente común de IFN de tipo I (Taams *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta el estado anérgico de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, el mecanismo por el cual $IFN\beta$ podría estar rescatando células nTreg de apoptosis podría ser similar al propuesto para células $CD4^+$ inducidas a anergia por presentación antigénica T:T (Lombardi *et al.*, 2000). Estos autores sugieren que la prevención de muerte celular mediada por $IFN\alpha/\beta$ se da por la reversión de la translocación del citoplasma al núcleo de PKC- δ . Este mecanismo junto con la capacidad de $IFN\alpha/\beta$ de inhibir la activación de caspasa-3 y de inducir la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl- x_L (Gombert *et al.*, 1996; Pilling *et al.*, 1999; Scheel-Toellner *et al.*, 1999), muestran la interferencia de los IFN de tipo I con las fases de inducción, compromiso y ejecución de la apoptosis. Nuestros resultados en relación con la expresión de Bcl- x_L en células $CD4^+CD25^+$ tratadas con $IFN\beta$ (Fig. 12Aii) podría explicar, al menos parcialmente, la mayor supervivencia de células nTreg en presencia de este tratamiento.

La correlación que hemos encontrado *in vitro* entre el aumento de actividad y número de células nTreg y la disminución de IL-17, está de acuerdo con la encontrada *in vivo* en bazo de ratones tratados con el fármaco (Figs. 14 y 15). Tanto la ruta de desarrollo de células Th17 como la de células nTreg están dirigidas por TGF- β (Bettelli *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006). Sin embargo, ambos fenotipos son mutuamente excluyentes, y la diferenciación hacia uno u otro depende de la presencia de citoquinas inflamatorias como IL-6 o IL-21, capaces de inhibir la generación de células Treg $Foxp3^+$ inducida por TGF- β (Bettelli *et al.*, 2006). Esta exclusión recíproca de fenotipos estaría de acuerdo con la correlación encontrada en nuestros resultados entre la disminución de IL-17 y el aumento de células nTreg mediados por $IFN\beta$. Estos datos coinciden con el análisis realizado en 18 pacientes de EMRR durante seis meses de

tratamiento con IFN β , donde se describe un aumento en la frecuencia y función supresora de células reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) en sangre periférica (Namdar *et al.*, 2010). Nuestros resultados demuestran que en EAE, además de en órganos linfoides, existe una disminución de la expresión de IL-17 en médula espinal después del tratamiento con IFN β (Fig. 16).

Otra observación que se desprende de nuestros resultados es que, mientras el tratamiento con IFN β es capaz de proteger las células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ de la apoptosis espontánea típica de este fenotipo (Fig. 12A), no es capaz de rescatar de apoptosis a otras células CD4⁺ (Fig. 12B). De hecho, la presencia de IFN β conlleva un ligero aumento en la apoptosis de este cultivo celular. Aunque nuestros datos no expliquen esta diferente respuesta a IFN β en cuanto a apoptosis entre células efectoras y nTreg, podría pensarse que el aumento de nTreg en la población de CD4⁺ tratada con IFN β esté favoreciendo la apoptosis de células efectoras. Esta posibilidad está apoyada por el hecho de que uno de los mecanismos propuestos para la función reguladora de células nTreg es la inducción de apoptosis de células efectoras por privación de IL-2, debido al alto consumo de esta citoquina por parte de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Pandiyani *et al.*, 2007).

Otro de los efectos diferenciales de IFN β que hemos encontrado sobre distintos tipos celulares, es el relacionado con los subtipos CD4⁺ y CD8⁺. Hemos observado un efecto antiproliferativo de IFN β sobre células T CD4⁺, que no es ejercido sobre CD8⁺ (Fig. 7). Dado que un número mayor de células reguladoras CD25⁺Foxp3⁺ son capaces de sobrevivir en un cultivo de células totales CD4⁺ pretratado con IFN β (Fig. 11), la proliferación de células efectoras en este cultivo podría ser suprimida de manera más eficiente que en el control sin tratamiento (Fig. 10). De acuerdo con esto, puede razonarse que la diferente respuesta a IFN β de células CD4⁺ y CD8⁺ se debe a la ausencia de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en la población de células CD8⁺. Además, este efecto antiproliferativo promovido por el fármaco no es debido a una parada de ciclo celular ni a un defecto en la expresión de la cadena α del receptor de IL-2 (Fig. 8). Sin embargo, la deficiente proliferación de células CD4⁺ se da incluso cuando el fármaco es eliminado del medio durante la segunda ronda de estimulación (Fig. 9). Esto implica que el resultado antiproliferativo de IFN β es debido a un efecto permanente introducido en la población CD4⁺ durante el proceso de definición de fenotipo en contacto con este fármaco. Nosotros proponemos que después de la señal de anti-CD3 inmovilizado, las

células nTreg que permanecen en el cultivo inhiben parcialmente la respuesta a la segunda ronda de activación de las células efectoras presentes en la misma población.

La segunda línea de investigación que ha seguido nuestro trabajo ha sido el estudio comparativo de la inhibición de PDE4 y PDE7 como posibles terapias anti-inflamatorias y neuroprotectoras. Asimismo, hemos analizado los efectos *in vivo* e *in vitro* de la inhibición simultánea de ambas PDE. Hemos podido comprobar que mientras la inhibición de PDE4 por Rolipram confiere un importante efecto terapéutico en EAE, la inhibición de PDE7 por BRL50481 no afecta al desarrollo de la enfermedad (Figs. 33 y 34). Sin embargo, la combinación de ambos inhibidores permitió disminuir la dosis de Rolipram de 5 a 2.5 mg/Kg con incluso mejores efectos terapéuticos en EAE (Fig. 34). Este resultado pone de manifiesto que el desarrollo de nuevos inhibidores duales para PDE4/PDE7 podría ser especialmente útil en el tratamiento de desórdenes inflamatorios o inmunológicos.

En este sentido hemos iniciado la caracterización de los efectos *in vitro* sobre células T de una colección de nuevos compuestos diseñados bien para la inhibición específica de PDE7, bien para la inhibición simultánea de PDE4/PDE7 (Tabla 5). Los nuevos compuestos, preparados por el grupo de las Dras. A. Martínez y C. Gil (Instituto de Química Médica, CSIC), están basados en derivados del sistema de benzotiadiazina, que constituyó la primera familia de compuestos heterocíclicos con propiedades de inhibición de PDE7, la cual fue desarrollada por el mismo grupo (Martínez *et al.*, 2000). De esta colección de compuestos hemos podido seleccionar algunos con toxicidad moderada (Fig. 17), con capacidad para aumentar los niveles de AMPc intracelular (Fig. 18) y para inhibir proliferación de células Th (Fig. 19A). Estas características les confieren cierto potencial para controlar procesos de inflamación mediados por células Th. Sin embargo, todos ellos presentaron IC₅₀ superior a la de los inhibidores disponibles comercialmente (Tabla 5).

Por otra parte, nuestros resultados *in vitro* muestran un aumento en los niveles de AMPc (Fig 18) mucho más acusado por la inhibición de PDE4 que por la inhibición de PDE7. Esto es probablemente debido a que PDE4 es la PDE mayoritaria en linfocitos T (Peter *et al.*, 2007). Sin embargo, la inhibición simultánea de PDE4 y PDE7 mostró un efecto sinérgico en el aumento de AMPc (Fig 20A), que está de acuerdo con datos previamente publicados (Smith *et al.*, 2004). Es bien conocida la capacidad que tiene AMPc para inhibir la proliferación de diferentes tipos celulares y particularmente de linfocitos T, en los que parece disparar una serie de señales intracelulares represoras,

mediadas por proteínas de anclaje a PKA, que permiten a la célula T mantenerse en estado de reposo (Williams, 2002; Hirose *et al.*, 2008). Por tanto, no es sorprendente el efecto antiproliferativo encontrado en nuestro trabajo para los inhibidores de PDE analizados. Este efecto es detectado incluso para los inhibidores de PDE7 que producen aumentos mínimos de AMPc intracelular (Fig. 19A). Algunas comunicaciones previas han propuesto que células Th1 son más sensibles al efecto antiproliferativo de AMPc que células Th2, lo que favorecería el desarrollo de este último fenotipo (Rott *et al.*, 1993; Son *et al.*, 2006), mientras que otras muestran que AMPc inhibe la actividad de ambos subtipos celulares (Williams, 2002; Yamamoto *et al.*, 2006). Nuestros resultados están de acuerdo con estas últimas afirmaciones y muestran que en linfocitos de fenotipo Th ya definido existe una sensibilidad similar de todos ellos a cualquiera de los inhibidores de PDE que hemos ensayado (Fig. 22).

Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con los inhibidores de PDE durante el proceso de definición de fenotipo Th, la presencia de Rolipram confirió una mayor capacidad proliferativa en respuesta a una segunda ronda de activación del TCR, que no fue observada por la inhibición de PDE7 (Fig. 26). Hay que señalar que los fármacos no estuvieron presentes en esta segunda ronda de activación, de lo que se deduce que el efecto producido por Rolipram tiene lugar durante la activación primaria de las células *naïve*. Descartamos que este aumento de proliferación sea debido a una disminución de células nTreg en la población, ya que los niveles de expresión del factor de transcripción Foxp3 no disminuyeron en los cultivos que se habían diferenciado en presencia de Rolipram respecto a los cultivos control (no mostrado). Sin embargo, encontramos una correlación entre el aumento de proliferación y la disminución en apoptosis de linfocitos CD4⁺ bajo tratamiento con Rolipram (Fig. 27). Por tanto, pensamos que la apoptosis derivada de la activación por TCR, que es un mecanismo que impide la excesiva activación de células T durante la respuesta inmune (Krammer *et al.*, 2007), es evitada por la inhibición de PDE4. Esta hipótesis está de acuerdo con los resultados de Gupta *et al.* (1999), quienes encontraron que la presencia de Pentoxifilina (inhibidor inespecífico de PDE) durante el establecimiento del linfocito T maduro producía un aumento en la proliferación en respuesta a una segunda ronda de activación. Otros autores propusieron un efecto similar en la proliferación celular, debido a la inhibición específica de PDE4 y no a la inhibición de PDE7 ni PDE3, relacionado con activación de PKA-I y prevención de inducción de caspasas (Vig *et al.*, 2002).

También observamos un aumento en la proliferación celular de linfocitos CD4⁺ de bazo mediado por tratamiento *in vivo* con Rolipram al comienzo del desarrollo de EAE (D8) (Fig. 35). Puesto que también existe un aumento de Foxp3 en las mismas muestras (Fig. 41), el efecto de Rolipram *in vivo* sobre la proliferación no puede ser explicado por una disminución de células nTreg. Por ésto consideramos muy probable que, al igual que en el tratamiento *in vitro*, esté teniendo lugar una prevención de la apoptosis. Sin embargo, este aumento en la proliferación de células CD4⁺ dejó de detectarse durante las fases aguda y crónica de la enfermedad (D14 y D21) (Fig. 35B y C).

Respecto a los resultados *in vitro* de la inhibición de PDE sobre la expresión de citoquinas características de los fenotipos Th1 y Th2, existen diversos antecedentes en los que se analizan las consecuencias de la inhibición de PDE sobre la producción de IFN- γ e IL-4 por linfocitos T. Sin embargo, los datos presentan un alto grado de heterogeneidad. En algunos casos se propone una disminución selectiva de IFN- γ sin efectos sobre IL-4, o incluso estimulando su producción (Navikas *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2000; Claveau *et al.*, 2004) mientras que en otros se ha encontrado disminución de ambos factores (Liang *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2006). En ninguno de estos ensayos previos a nuestro trabajo se había analizado el efecto permanente que la inhibición de PDE imprime en las células durante el proceso de definición de fenotipo. El momento concreto de análisis de la producción de citoquinas en los diferentes trabajos, donde se puedan estar detectando efectos transitorios o permanentes, podría ser la razón para la disparidad de los datos disponibles hasta la fecha.

Nosotros hemos analizado dos procesos diferentes: los efectos de la inhibición de PDE4 y de PDE7 producidos sobre linfocitos de fenotipo Th ya definido (Figs. 23-25), y los manifestados después de retirar los fármacos en células en que la inhibición de PDE ha tenido lugar durante la definición del fenotipo (Figs. 28-31). Mediante este análisis concluimos que, aunque la inhibición de PDE4 en células definidas disminuye la expresión de IFN- γ (Fig. 23), para la represión permanente de su expresión es necesaria la inhibición simultánea de ambas PDE durante el proceso de definición de fenotipo (Fig. 28). En cuanto a los efectos sobre la expresión de IL-4, nuestros datos indican que la inhibición de PDE4 por sí sola es capaz de reducir los niveles de IL-4 en ambos tipos de ensayo (Figs. 24 y 29); mientras que la inhibición de PDE7 no disminuye la producción de esta citoquina anti-inflamatoria. Aunque el clon D10.G4.1 mostró mayor sensibilidad a la inhibición de PDE7 respecto a producción de IL-4 (Fig.

19), puede pensarse que ésta sea una característica muy concreta de este clon establecido.

En cuanto a la producción de IL-17, algunos datos de la bibliografía sugieren que el aumento de AMPc disminuye sus niveles de expresión (Ma *et al.*, 2008; Goto *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros resultados demuestran un aumento en los niveles de IL-17 mediado por el tratamiento *in vitro* de células CD4⁺ con Rolipram. Este efecto de Rolipram se observó tanto en el tratamiento de linfocitos de fenotipo Th definido (Fig 25), como durante el proceso de definición de fenotipo Th (Fig. 30). Además, tiene lugar desde etapas tempranas del proceso de definición de fenotipo Th (D3), y es independiente de que las condiciones de inducción de células Th17 estén favorecidas por la presencia de TGF- β e IL-6, ya que se da en condiciones de cultivo Th0. Además, los ensayos de tinción intracelular muestran que Rolipram tiene un efecto en el porcentaje de células que se definen a productoras de IL-17 (Fig 31). Durante la preparación de este manuscrito ha sido publicado un trabajo en el que se determina que la ruta AMPc/PKA induce factores secretados por células dendríticas que estimulan la secreción de IL-17 por células T CD4⁺ (Datta *et al.*, 2010). Nuestros resultados muestran un efecto directo de la inhibición de PDE4 sobre células T CD4⁺ productoras de IL-17, indicando que además de los efectos indirectos a través de células NK encontrados por Datta *et al.* (2010), el aumento de AMPc promovido por Rolipram en células CD4⁺ estimula la expresión de IL-17. Nuestros datos no pueden asegurar que el aumento de IL-17 debido a Rolipram y la sinergia producida por la inhibición de ambas PDE esté mediado por la ruta AMPc/PKA, para lo que sería necesario trabajo experimental que involucrase la utilización de inhibidores de PKA como KT5720. Sin embargo, es muy probable que esto sea así teniendo en cuenta que se ha descrito que células CD4⁺ en presencia de VIP (*Vasoactive intestinal peptide*) y TGF- β , pueden diferenciarse hacia un fenotipo Th17 productor de IL-17, siguiendo una ruta dependiente de AMPc/PKA (Yadav *et al.*, 2008).

Dada la implicación que tiene IL-17 en procesos inflamatorios, el aumento en la expresión de IL-17 mediado por Rolipram fue un resultado inesperado, ya que este fármaco había sido previamente descrito como un efectivo agente anti-inflamatorio (de Visser *et al.*, 2008), con efectos terapéuticos para EAE en modelos animales de rata (Sanchez *et al.*, 2005). Además del aumento de IL-17 producido por el tratamiento *in vitro* con Rolipram, la utilización de este fármaco *in vivo* sobre EAE también conduce a un aumento en los niveles de expresión de IL-17 durante los primeros días de

tratamiento (Fig 36). Pese a este aumento inicial, en las fases aguda y crónica de la enfermedad los niveles de IL-17 fueron menores en los animales tratados con Rolipram que en los controles sin tratar, tanto en órganos linfoides como en SNC (Figs 37-39). Esto correlaciona con la disminución de los síntomas clínicos de EAE bajo tratamiento con Rolipram (Figs 33 y 34). Podría pensarse que la tendencia de células CD4⁺ a aumentar la producción de IL-17 en presencia de Rolipram fuese contrarrestada por otros tipos celulares en los animales tratados con el fármaco. Esta hipótesis estaría apoyada por el resultado de la figura 32, en el que se muestra que, a diferencia de lo encontrado para células CD4⁺ purificadas, el tratamiento de una población completa de células de bazo no conduce a un aumento en los niveles de IL-17. Para determinar qué tipo o tipos celulares están implicados en evitar el aumento de los niveles de IL-17 será necesario realizar ensayos en los que la población total de bazo sea deplecionada de las distintas subpoblaciones celulares que la componen.

Los niveles de IL-10 también fueron incrementados por el tratamiento *in vivo* con Rolipram (Fig. 40), lo que podría estar regulando los efectos adversos de IL-17. IL-10 está fuertemente implicada en el control de la actividad de linfocitos T (Fujio *et al.*, 2010; Jankovic *et al.*, 2010). Además, se ha descrito la existencia de un fenotipo de células generadas *in vitro* en ausencia de IL-23 que expresan simultáneamente IL-17 e IL-10 y no presentan fenotipo inflamatorio en EAE (McGeachy *et al.*, 2007). Nosotros no hemos podido detectar mediante ensayos de tinción intracelular la existencia de un fenotipo que exprese ambas citoquinas simultáneamente (no mostrado); no obstante, la IL-10 producida por células independientes de las productoras de IL-17, puede ser un factor que contrarreste los efectos de IL-17. En este sentido, se sabe que la inhibición selectiva de PDE4 por Rolipram, y no la inhibición de otras PDE, aumenta los niveles de IL-10 producidos por macrófagos y células dendríticas (Kambayashi *et al.*, 1995; Kambayashi *et al.*, 2001).

Además, el factor de transcripción Foxp3, característico de células nTreg, mostró un aumento en las muestras de animales tratados con Rolipram. Este aumento fue encontrado en las tres fases del proceso de EAE analizadas (Fig. 41) y podría indicar una mayor presencia en células reguladoras que, junto con IL-10, favoreciera la neutralización de los efectos del aumento de IL-17 en las fases tempranas. Uno de los mecanismos propuestos recientemente como mediador en la supresión de células nTreg sobre células efectoras, es la transferencia célula-célula de AMPc (Bopp *et al.*, 2007). Esto hace pensar que parte del efecto terapéutico de Rolipram sobre EAE podría estar

determinado por la actividad de células nTreg, puesto que la inhibición de PDE4 por Rolipram puede aumentar la potencia supresora de células nTreg sobre células T efectoras (Bopp *et al.*, 2009).

Por otra parte, hay que señalar que algunos de los efectos detectados *in vitro* por la utilización de Rolipram o la combinación de Rolipram y BRL50481, no son observados por la utilización de TC3.6 (dual de PDE4/PDE7). Esto es probablemente debido a que este compuesto presenta unas IC₅₀ para PDE4 y PDE7 superiores a las de Rolipram y BRL50481. Así, en células que definen su fenotipo Th en presencia de TC3.6 no existe ni la disminución en los niveles de IL-4, ni el aumento de IL-17, que se observan con Rolipram (Figs. 24, 30 y 31). Sin embargo, este inhibidor dual sí presenta la misma potencia que la combinación de Rolipram y BRL50481 para reducir la producción de IFN- γ , propia de ambientes inflamatorios (Fig. 28). Estas características hacen pensar que el desarrollo de inhibidores duales con baja especificidad para PDE4 (que minimicen los efectos secundarios de émesis y náuseas) podrían ser de utilidad en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Aunque será necesario analizar a fondo la actividad de este tipo de compuestos *in vivo* sobre modelos animales, resultados preliminares sugieren un efecto terapéutico de TC3.6 en EAE (no mostrado).

En resumen, nuestros resultados indican que el efecto terapéutico en EAE, tanto de IFN β como de la inhibición de PDE4, correlacionan con un aumento de células Foxp3⁺ y una disminución de los niveles de IL-17. En el caso de IFN β se muestra la acumulación de células nTreg en un cultivo CD4⁺, probablemente debido al rescate de apoptosis. Este rescate observado *in vitro* puede también estar actuando como control de células efectoras que produzcan daño *in vivo*. Para el caso de Rolipram, no hemos podido probar cambios en la población nTreg como un efecto directo sobre células CD4⁺. Por tanto, el aumento de expresión encontrado para Foxp3 en el tratamiento *in vivo* hace pensar que Rolipram podría ejercer este efecto indirectamente, a través de la actividad de otros tipos celulares que secretasen factores, como TGF- β , favoreciendo la presencia de células nTreg Foxp3⁺. Será de interés analizar estos parámetros *in vitro* en poblaciones totales de órganos linfoides bajo tratamiento con este fármaco. Además, el descenso en la expresión de IL-17 promovido por los tratamientos *in vivo* con IFN β y Rolipram podría colaborar en el efecto terapéutico de ambos fármacos. Es bien conocido el papel patogénico de IL-17 en EAE (Onishi and Gaffen, 2010) y EM (Matusevicius *et al.*, 1999; Kebir *et al.*, 2007; Tzartos *et al.*, 2008), por lo que se han

estudiado diversas aproximaciones terapéuticas para el modelo animal, basadas en la inmunización activa contra IL-17 (Hofstetter *et al.*, 2005; Rohn *et al.*, 2006). Por otra parte, hemos comprobado que Rolipram media aumento de IL-10, y este efecto también podría colaborar en sus efectos anti-inflamatorios. Finalmente, nuestros resultados para el tratamiento de EAE con la combinación de Rolipram y BRL50481 ponen de manifiesto la ventaja que puede suponer en clínica el desarrollo de inhibidores duales de PDE4 y PDE7.

CONCLUSIONES

1. IFN β promueve la supervivencia de células nTreg Foxp3⁺ murinas *in vitro*.
2. La producción de IL-17 por células CD4⁺ *naïve* es inhibida por IFN β mediante un proceso dependiente de la población nTreg.
3. El tratamiento de EAE-MBP con IFN β favorece la acumulación de células CD4⁺CD25⁺GITR⁺Foxp3⁺ en bazo y disminuye la expresión de IL-17 en periferia y en SNC.
4. La inhibición de PDE4 es más eficaz que la de PDE7 en el incremento de los niveles de AMPc intracelular en linfocitos T, mientras que la inhibición simultánea de ambas PDE presenta un efecto sinérgico.
5. La apoptosis inducida por activación de células T CD4⁺ a través del TCR es prevenida por Rolipram.
6. Rolipram favorece la diferenciación *in vitro* de linfocitos T CD4⁺ hacia el fenotipo Th17.
7. El aumento inicial de IL-17 en el tratamiento de EAE con Rolipram, es revertido durante las fases aguda y crónica de la enfermedad en órganos periféricos y en SNC.
8. La inhibición de PDE4 promueve la expresión de IL-10 y Foxp3 en el tratamiento de EAE.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, N., L. P. Zou, S. H. Pelidou, B. Winblad and J. Zhu (2000). "Protective effect of Rolipram in experimental autoimmune neuritis: protection is associated with down-regulation of IFN-gamma and inflammatory chemokines as well as up-regulation of IL-4 in peripheral nervous system." Autoimmunity **32**(2): 93-99.
- Abrams, J.S., M.G. Roncarolo, H. Yssel, U. Anderson, G.J. Gleich and J. Silver (1992). "Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development." Immunol. Rev. **127**: 5-24.
- Aggarwal, S., N. Ghilardi, M. H. Xie, F. J. de Sauvage and A. L. Gurney (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." J Biol Chem **278**(3): 1910-1914.
- Akassoglou, K., J. Bauer, G. Kassiotis, M. Pasparakis, H. Lassmann, G. Kollias and L. Probert (1998). "Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendrogliopathy." Am J Pathol **153**(3): 801-813.
- Akbari, O., P. Stock, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2003). "Role of regulatory T cells in allergy and asthma." Curr Opin Immunol **15**(6): 627-633.
- Alleva, D. G., E. B. Johnson, J. Wilson, D. I. Beller and P. J. Conlon (2001). "SJL and NOD macrophages are uniquely characterized by genetically programmed, elevated expression of the IL-12(p40) gene, suggesting a conserved pathway for the induction of organ-specific autoimmunity." J Leukoc Biol **69**(3): 440-448.
- Anderson, A. C., L. B. Nicholson, K. L. Legge, V. Turchin, H. Zaghouani and V. K. Kuchroo (2000). "High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire." J Exp Med **191**(5): 761-770.
- Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo and D. Sacks (2007). "CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis." J Exp Med **204**(2): 285-297.
- Awasthi, A. and V. K. Kuchroo (2009). "Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection." Int Immunol **21**(5): 489-498.
- Axtell, R. C., B. A. de Jong, K. Boniface, L. F. van der Voort, R. Bhat, P. De Sarno, R. Naves, M. Han, F. Zhong, J. G. Castellanos, R. Mair, A. Christakos, I. Kolkowitz, L. Katz, J. Killestein, C. H. Polman, R. de Waal Malefyt, L. Steinman and C. Raman (2010). "T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis." Nat Med.
- Ayyoub, M., F. Deknuydt, I. Raimbaud, C. Dousset, L. Leveque, G. Bioley and D. Valmori (2009). "Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(21): 8635-8640.
- Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schroder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid and K. Rajewsky (2000). "Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction." J Exp Med **192**(3): 393-404.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman and D. A. Hafler (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-1253.

- Baecher-Allan, C. and D. A. Hafler (2006). "Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease." *Immunol Rev* **212**: 203-216.
- Bar-Or, A., E. M. Oliveira, D. E. Anderson and D. A. Hafler (1999). "Molecular pathogenesis of multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **100**(1-2): 252-259.
- Barkhatova, V. P., I. A. Zavalishin, LSh Askarova, VKh Shavratskii and E. G. Demina (1998). "Changes in neurotransmitters in multiple sclerosis." *Neurosci Behav Physiol* **28**(4): 341-344.
- Barnes, P. J. (2008). "Role of GATA-3 in allergic diseases." *Curr Mol Med* **8**(5): 330-334.
- Barnett, M. H., J. D. Parratt, E. S. Cho and J. W. Prineas (2009). "Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue." *Ann Neurol* **65**(1): 32-46.
- Baxter, A. G. (2007). "The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Nat Rev Immunol* **7**(11): 904-912.
- Beck, J., P. Rondot, L. Catinot, E. Falcoff, H. Kirchner and J. Wietzerbin (1988). "Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations?" *Acta Neurol Scand* **78**(4): 318-323.
- Bender, A. T. and J. A. Beavo (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use." *Pharmacol Rev* **58**(3): 488-520.
- Berger, T., S. Weerth, K. Kojima, C. Linington, H. Wekerle and H. Lassmann (1997). "Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system." *Lab Invest* **76**(3): 355-364.
- Berman, J. W., M. P. Guida, J. Warren, J. Amat and C. F. Brosnan (1996). "Localization of monocyte chemoattractant peptide-1 expression in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and trauma in the rat." *J Immunol* **156**(8): 3017-3023.
- Bernardelli, P., E. Lorthiois, F. Vergne, C. Oliveira, A. K. Mafroud, E. Proust, N. Pham, P. Ducrot, F. Moreau, M. Idrissi, A. Tertre, B. Bertin, M. Coupe, E. Chevalier, A. Descours, F. Berlioz-Seux, P. Berna and M. Li (2004). "Spiroquinazolinones as novel, potent, and selective PDE7 inhibitors. Part 2: Optimization of 5,8-disubstituted derivatives." *Bioorg Med Chem Lett* **14**(18): 4627-4631.
- Bertolotto, A. and F. Gilli (2008). "Interferon-beta responders and non-responders. A biological approach." *Neurol Sci* **29 Suppl 2**: S216-217.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-238.
- Bettelli, E., M. P. Das, E. D. Howard, H. L. Weiner, R. A. Sobel and V. K. Kuchroo (1998). "IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice." *J Immunol* **161**(7): 3299-3306.
- Bodor, J., A. L. Spetz, J. L. Strominger and J. F. Habener (1996). "cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3536-3541.
- Bongioanni, P., S. Mosti, G. Moscato, F. Lombardo, C. Manildo and G. Meucci (1999). "Decreases in T-cell tumor necrosis factor alpha binding with interferon beta treatment in patients with multiple sclerosis." *Arch Neurol* **56**(1): 71-78.
- Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit and E. Schmitt (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is

- a key component of regulatory T cell-mediated suppression." *J Exp Med* **204**(6): 1303-1310.
- Bopp, T., N. Dehzad, S. Reuter, M. Klein, N. Ullrich, M. Stassen, H. Schild, R. Buhl, E. Schmitt and C. Taube (2009). "Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression." *J Immunol* **182**(7): 4017-4024.
- Boswell-Smith, V., D. Spina and C. P. Page (2006). "Phosphodiesterase inhibitors." *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: S252-257.
- Brodie, C., N. Goldreich, T. Haiman and G. Kazimirsky (1998). "Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion." *J Neuroimmunol* **81**(1-2): 20-30.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepers, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* **27**(1): 68-73.
- Castano, T., H. Wang, N. E. Campillo, S. Ballester, C. Gonzalez-Garcia, J. Hernandez, C. Perez, J. Cuenca, A. Perez-Castillo, A. Martinez, O. Huertas, J. L. Gelpi, F. J. Luque, H. Ke and C. Gil (2009). "Synthesis, structural analysis, and biological evaluation of thioxoquinazoline derivatives as phosphodiesterase 7 inhibitors." *ChemMedChem* **4**(5): 866-876.
- Castro, A., M. J. Jerez, C. Gil, F. Calderon, T. Domenech, A. Nueda and A. Martinez (2008). "CODES, a novel procedure for ligand-based virtual screening: PDE7 inhibitors as an application example." *Eur J Med Chem* **43**(7): 1349-1359.
- Claveau, D., S. L. Chen, S. O'Keefe, D. M. Zaller, A. Styhler, S. Liu, Z. Huang, D. W. Nicholson and J. A. Mancini (2004). "Preferential inhibition of T helper 1, but not T helper 2, cytokines in vitro by L-826,141 [4-[2-(3,4-Bisdifluoromethoxyphenyl)-2-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxy propan-2-yl)-phenyl]-ethyl]3-methylpyridine-1-oxide], a potent and selective phosphodiesterase 4 inhibitor." *J Pharmacol Exp Ther* **310**(2): 752-760.
- Coles, A. J., M. G. Wing, P. Molyneux, A. Paolillo, C. M. Davie, G. Hale, D. Miller, H. Waldmann and A. Compston (1999). "Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis." *Ann Neurol* **46**(3): 296-304.
- Collart, M. A., D. Belin, J. D. Vassalli, S. de Kossodo and P. Vassalli (1986). "Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors." *J Exp Med* **164**(6): 2113-2118.
- Conti, M. and J. Beavo (2007). "Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling." *Annu Rev Biochem* **76**: 481-511.
- Conway, D. and J. A. Cohen (2010). "Combination therapy in multiple sclerosis." *Lancet Neurol* **9**(3): 299-308.
- Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein and J. D. Sedgwick (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." *Nature* **421**(6924): 744-748.
- Charcot, J (1877). "Lectures on the diseases of the nervous system." London: New sydenham Society.
- Charcot, J. (1868). "Histologic de la sclerose en plaque." *Gaz Hôp* **41**: 544-546.

- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.
- Chen, Y., C. L. Langrish, B. McKenzie, B. Joyce-Shaikh, J. S. Stumhofer, T. McClanahan, W. Blumenschein, T. Churakovsa, J. Low, L. Presta, C. A. Hunter, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2006). "Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis." J Clin Invest **116**(5): 1317-1326.
- Chen, Z. and J. J. O'Shea (2008). "Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells." Immunol Res **41**(2): 87-102.
- Chu, C. Q., S. Wittmer and D. K. Dalton (2000). "Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **192**(1): 123-128.
- Dalakas, M. C. (2006). "B cells in the pathophysiology of autoimmune neurological disorders: a credible therapeutic target." Pharmacol Ther **112**(1): 57-70.
- Datta, S. K., M. Sabet, K. P. Nguyen, P. A. Valdez, J. M. Gonzalez-Navajas, S. Islam, I. Mihajlov, J. Fierer, P. A. Insel, N. J. Webster, D. G. Guiney and E. Raz (2010). "Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10638-10643.
- de Andres, C., C. Aristimuno, V. de Las Heras, M. L. Martinez-Gines, M. Bartolome, R. Arroyo, J. Navarro, S. Gimenez-Roldan, E. Fernandez-Cruz and S. Sanchez-Ramon (2007). "Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis." J Neuroimmunol **182**(1-2): 204-211.
- De Keyser, J., E. Zeinstra and E. Frohman (2003). "Are astrocytes central players in the pathophysiology of multiple sclerosis?" Arch Neurol **60**(1): 132-136.
- de Rosbo, N. K. and A. Ben-Nun (1998). "T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein." J Autoimmun **11**(4): 287-299.
- de Visser, Y. P., F. J. Walther, E. H. Laghmani, S. van Wijngaarden, K. Nieuwland and G. T. Wagenaar (2008). "Phosphodiesterase-4 inhibition attenuates pulmonary inflammation in neonatal lung injury." Eur Respir J **31**(3): 633-644.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-1220.
- de Waal Malefyt, R., H. Yssel and J. E. de Vries (1993). "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation." J Immunol **150**(11): 4754-4765.
- Deknuydt, F., G. Bioley, D. Valmori and M. Ayyoub (2009). "IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells." Clin Immunol **131**(2): 298-307.
- Dhib-Jalbut, S., H. Jiang and G. J. Williams (1996). "The effect of interferon beta-1b on lymphocyte-endothelial cell adhesion." J Neuroimmunol **71**(1-2): 215-222.
- Dinter, H. (2000). "Phosphodiesterase type 4 inhibitors: potential in the treatment of multiple sclerosis?" BioDrugs **13**(2): 87-94.
- Dong, H., V. Osanova, P. M. Epstein and S. Brocke (2006). "Phosphodiesterase 8 (PDE8) regulates chemotaxis of activated lymphocytes." Biochem Biophys Res Commun **345**(2): 713-719.

- Dorado, B., M. J. Jerez, N. Flores, F. M. Martin-Saavedra, C. Duran and S. Ballester (2002). "Autocrine IL-4 gene regulation at late phases of TCR activation in differentiated Th2 cells." *J Immunol* **169**(6): 3030-3037.
- Dorado, B., P. Portoles and S. Ballester (1998). "NF-kappaB in Th2 cells: delayed and long-lasting induction through the TCR complex." *Eur J Immunol* **28**(7): 2234-2244.
- Du, C., M. W. Khalil and S. Sriram (2001). "Administration of dehydroepiandrosterone suppresses experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice." *J Immunol* **167**(12): 7094-7101.
- Duong, T. T., J. St Louis, J. J. Gilbert, F. D. Finkelman and G. H. Strejan (1992). "Effect of anti-interferon-gamma and anti-interleukin-2 monoclonal antibody treatment on the development of actively and passively induced experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse." *J Neuroimmunol* **36**(2-3): 105-115.
- Dyke, H. J. and J. G. Montana (2002). "Update on the therapeutic potential of PDE4 inhibitors." *Expert Opin Investig Drugs* **11**(1): 1-13.
- Edwards, J. C. and G. Cambridge (2006). "B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." *Nat Rev Immunol* **6**(5): 394-403.
- Espejo, C., M. Penkowa, I. Sáez-Torres, J. Hidalgo, A. García, X. Montalban and E.M. Martínez-Cáceres (2002). "Interferon- γ regulates oxidative stress during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Experimental Neurology* **117**: 21-31.
- Essayan, D. M. (2001). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases." *J Allergy Clin Immunol* **108**(5): 671-680.
- Falcone, M., A. J. Rajan, B. R. Bloom and C. F. Brosnan (1998). "A critical role for IL-4 in regulating disease severity in experimental allergic encephalomyelitis as demonstrated in IL-4-deficient C57BL/6 mice and BALB/c mice." *J Immunol* **160**(10): 4822-4830.
- Faria, A. M. and H. L. Weiner (2005). "Oral tolerance." *Immunol Rev* **206**: 232-259.
- Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton and C. G. Fathman (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." *J Immunol* **156**(1): 5-7.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond and T. R. Mosmann (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." *J Exp Med* **170**(6): 2081-2095.
- Floris, S., S. R. Ruuls, A. Wierinckx, S. M. van der Pol, E. Dopp, P. H. van der Meide, C. D. Dijkstra and H. E. De Vries (2002). "Interferon-beta directly influences monocyte infiltration into the central nervous system." *J Neuroimmunol* **127**(1-2): 69-79.
- Folcik, V. A., T. Smith, S. O'Bryant, J. A. Kawczak, B. Zhu, H. Sakurai, A. Kajiwar, J. M. Staddon, A. Glabinski, A. L. Chernosky, M. Tani, J. M. Johnson, V. K. Tuohy, L. L. Rubin and R. M. Ransohoff (1999). "Treatment with BBB022A or rolipram stabilizes the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis: an additional mechanism for the therapeutic effect of type IV phosphodiesterase inhibitors." *J Neuroimmunol* **97**(1-2): 119-128.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-336.

- Frisullo, G., V. Nociti, R. Iorio, A. K. Patanella, A. Marti, B. Assunta, D. Plantone, G. Cammarota, P. A. Tonali and A. P. Batocchi (2009). "Increased CD4+CD25+Foxp3+ T cells in peripheral blood of celiac disease patients: correlation with dietary treatment." *Hum Immunol* **70**(6): 430-435.
- Fujio, K., T. Okamura and K. Yamamoto (2010). "The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells." *Adv Immunol* **105**: 99-130.
- Gaffen, S. L. (2008). "An overview of IL-17 function and signaling." *Cytokine* **43**(3): 402-407.
- Genain, C. P., T. Roberts, R. L. Davis, M. H. Nguyen, A. Uccelli, D. Faulds, Y. Li, J. Hedgpeth and S. L. Hauser (1995). "Prevention of autoimmune demyelination in non-human primates by a cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3601-3605.
- Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260.
- Giembycz, M. A., C. J. Corrigan, J. Seybold, R. Newton and P. J. Barnes (1996). "Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2." *Br J Pharmacol* **118**(8): 1945-1958.
- Giembycz, M. A. and S. J. Smith (2006). "Phosphodiesterase 7A: a new therapeutic target for alleviating chronic inflammation?" *Curr Pharm Des* **12**(25): 3207-3220.
- Gijbels, K., S. Brocke, J. S. Abrams and L. Steinman (1995). "Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation." *Mol Med* **1**(7): 795-805.
- Gillis, S. (1977). "Long-term culture of tumour-specific cytotoxic T cells." *Nature* **268**: 158-166.
- Gombert, W., N. J. Borthwick, D. L. Wallace, H. Hyde, M. Bofill, D. Pilling, P. C. Beverley, G. Janossy, M. Salmon and A. N. Akbar (1996). "Fibroblasts prevent apoptosis of IL-2-deprived T cells without inducing proliferation: a selective effect on Bcl-XL expression." *Immunology* **89**(3): 397-404.
- Gonzalez, G. A. and M. R. Montminy (1989). "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133." *Cell* **59**(4): 675-680.
- Gonzalez, G. A., K. K. Yamamoto, W. H. Fischer, D. Karr, P. Menzel, W. Biggs, 3rd, W. W. Vale and M. R. Montminy (1989). "A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence." *Nature* **337**(6209): 749-752.
- Goodkin, D. E., S. Plencner, J. Palmer-Saxerud, M. Teetzen and D. Hertsgaard (1987). "Cyclophosphamide in chronic progressive multiple sclerosis. Maintenance vs nonmaintenance therapy." *Arch Neurol* **44**(8): 823-827.
- Goto, M., M. Murakawa, K. Kadoshima-Yamaoka, Y. Tanaka, H. Inoue, H. Murafuji, Y. Hayashi, K. Miura, T. Nakatsuka, K. Nagahira, K. Chamoto, Y. Fukuda and T. Nishimura (2009). "Phosphodiesterase 7A inhibitor ASB16165 suppresses proliferation and cytokine production of NKT cells." *Cell Immunol* **258**(2): 147-151.
- Gran, B., G. X. Zhang, S. Yu, J. Li, X. H. Chen, E. S. Ventura, M. Kamoun and A. Rostami (2002). "IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in

- the induction of central nervous system autoimmune demyelination." J Immunol **169**(12): 7104-7110.
- Gray, P. W. and D. V. Goeddel (1983). "Cloning and expression of murine immune interferon cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(19): 5842-5846.
- Group, The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis (1999). "TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. ." Neurology **53**(3): 457-465.
- Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1998). "Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells." J Immunol **160**(7): 3188-3193.
- Guo, B., E. Y. Chang and G. Cheng (2008). "The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice." J Clin Invest **118**(5): 1680-1690.
- Gupta, M., A. George, R. Sen, S. Rath, J. M. Durdik and V. Bal (1999). "Presence of pentoxifylline during T cell priming increases clonal frequencies in secondary proliferative responses and inhibits apoptosis." J Immunol **162**(2): 689-695.
- Haas, J., A. Hug, A. Viehover, B. Fritzsche, C. S. Falk, A. Filser, T. Vetter, L. Milkova, M. Korporal, B. Fritz, B. Storch-Hagenlocher, P. H. Krammer, E. Suri-Payer and B. Wildemann (2005). "Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis." Eur J Immunol **35**(11): 3343-3352.
- Habener, J. F., T. E. Meyer, Y. Yun, G. Waeber and J. P. Hoeffler (1990). "Characterization of a cAMP-regulated enhancer-binding protein." Metabolism **39**(9 Suppl 2): 13-16.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.
- Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould and C. H. Smith (2008). "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." N Engl J Med **358**(7): 676-688.
- Hebenstreit, D., G. Wirnsberger, J. Horejs-Hoeck and A. Duschl (2006). "Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6." Cytokine Growth Factor Rev **17**(3): 173-188.
- Hermann-Kleiter, N. and G. Baier (2010). "NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions." Blood **115**(15): 2989-2997.
- Hilliard, B. A., N. Mason, L. Xu, J. Sun, S. E. Lamhamedi-Cherradi, H. C. Liou, C. Hunter and Y. H. Chen (2002). "Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation." J Clin Invest **110**(6): 843-850.
- Hirose, R., H. Manabe, K. Yanagawa, E. Ohshima and M. Ichimura (2008). "Differential effects of PDE4 inhibitors on cortical neurons and T-lymphocytes." J Pharmacol Sci **106**(2): 310-317.
- Hoeffler, J. P., T. E. Meyer, Y. Yun, J. L. Jameson and J. F. Habener (1988). "Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA." Science **242**(4884): 1430-1433.
- Hofman, F. M., R. I. von Hanwehr, C. A. Dinarello, S. B. Mizel, D. Hinton and J. E. Merrill (1986). "Immunoregulatory molecules and IL 2 receptors identified in multiple sclerosis brain." J Immunol **136**(9): 3239-3245.

- Hofstetter, H. H., S. M. Ibrahim, D. Koczan, N. Kruse, A. Weishaupt, K. V. Toyka and R. Gold (2005). "Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis." Cell Immunol **237**(2): 123-130.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.
- Housley, W. J., C. A. O'Connor, F. Nichols, L. Puddington, E. G. Lingenheld, L. Zhu and R. B. Clark (2009). "PPARgamma regulates retinoic acid-mediated DC induction of Tregs." J Leukoc Biol **86**(2): 293-301.
- Hsieh, C. S., A. B. Heimberger, J. S. Gold, A. O'Garra and K. M. Murphy (1992). "Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6065-6069.
- Huseby, E. S., D. Liggitt, T. Brabb, B. Schnabel, C. Ohlen and J. Goverman (2001). "A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis." J Exp Med **194**(5): 669-676.
- Ichiyama, K., H. Yoshida, Y. Wakabayashi, T. Chinen, K. Saeki, M. Nakaya, G. Takaesu, S. Hori, A. Yoshimura and T. Kobayashi (2008). "Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat." J Biol Chem **283**(25): 17003-17008.
- Issazadeh, S., M. Mustafa, A. Ljungdahl, B. Hojeberg, A. Dagerlind, R. Elde and T. Olsson (1995). "Interferon gamma, interleukin 4 and transforming growth factor beta in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: dynamics of cellular mRNA expression in the central nervous system and lymphoid cells." J Neurosci Res **40**(5): 579-590.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-1133.
- Ivashkiv, L. B. and X. Hu (2004). "Signaling by STATs." Arthritis Res Ther **6**(4): 159-168.
- Jacobs, L., J. O'Malley, A. Freeman and R. Ekes (1981). "Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis." Science **214**(4524): 1026-1028.
- Jankovic, D., D. G. Kugler and A. Sher (2010). "IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation." Mucosal Immunol **3**(3): 239-246.
- Jankovic, D., M. C. Kullberg, C. G. Feng, R. S. Goldszmid, C. M. Collazo, M. Wilson, T. A. Wynn, M. Kamanaka, R. A. Flavell and A. Sher (2007). "Conventional Tbet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection." J Exp Med **204**(2): 273-283.
- Jansson, L., P. Diener, A. Engstrom, T. Olsson and R. Holmdahl (1995). "Spreading of the immune response to different myelin basic protein peptides in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in B10.RIII mice." Eur J Immunol **25**(8): 2195-2200.
- Jiang, H., S. I. Zhang and B. Pernis (1992). "Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis." Science **256**(5060): 1213-1215.
- Jinquan, T., C. G. Larsen, B. Gesser, K. Matsushima and K. Thestrup-Pedersen (1993). "Human IL-10 is a chemoattractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4+ T lymphocyte migration." J Immunol **151**(9): 4545-4551.
- Juedes, A. E., P. Hjelmstrom, C. M. Bergman, A. L. Neild and N. H. Ruddle (2000). "Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight

- into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **164**(1): 419-426.
- Jung, E. J., M. Hur, Y. L. Kim, G. H. Lee, J. Kim, I. Kim, M. Lee, H. K. Han, M. S. Kim, S. Hwang, S. Kim, A. M. Woo, Y. Yoon, H. J. Park and J. Won (2009). "Oral administration of 1,4-aryl-2-mercaptoimidazole inhibits T-cell proliferation and reduces clinical severity in the murine experimental autoimmune encephalomyelitis model." *J Pharmacol Exp Ther* **331**(3): 1005-1013.
- Kambayashi, T., C. O. Jacob, D. Zhou, N. Mazurek, M. Fong and G. Strassmann (1995). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages." *J Immunol* **155**(10): 4909-4916.
- Kambayashi, T., R. P. Wallin and H. G. Ljunggren (2001). "cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function." *J Leukoc Biol* **70**(6): 903-910.
- Karasuyama, H. and F. Melchers (1988). "Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors." *Eur J Immunol* **18**(1): 97-104.
- Karin, M. and A. Lin (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." *Nat Immunol* **3**(3): 221-227.
- Karlsson, M. R., J. Rugtveit and P. Brandtzaeg (2004). "Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy." *J Exp Med* **199**(12): 1679-1688.
- Kassiotis, G., J. Bauer, K. Akassoglou, H. Lassmann, G. Kollias and L. Probert (1999). "A tumor necrosis factor-induced model of human primary demyelinating diseases develops in immunodeficient mice." *Eur J Immunol* **29**(3): 912-917.
- Kaye, J., S. Porcelli, J. Tite, B. Jones and C. A. Janeway, Jr. (1983). "Both a monoclonal antibody and antisera specific for determinants unique to individual cloned helper T cell lines can substitute for antigen and antigen-presenting cells in the activation of T cells." *J Exp Med* **158**(3): 836-856.
- Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher and A. Prat (2007). "Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation." *Nat Med* **13**(10): 1173-1175.
- Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn and A. S. Fauci (1986). "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth." *J Exp Med* **163**(5): 1037-1050.
- Kennedy, M. K., D. S. Torrance, K. S. Picha and K. M. Mohler (1992). "Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery." *J Immunol* **149**(7): 2496-2505.
- Khattari, R., T. Cox, S. A. Yasayko and F. Ramsdell (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." *Nat Immunol* **4**(4): 337-342.
- Khoury, S. J., W. W. Hancock and H. L. Weiner (1992). "Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain." *J Exp Med* **176**(5): 1355-1364.
- Kim, H., C. Moon, M. Ahn, Y. Lee, S. Kim, Y. Matsumoto, C. S. Koh, M. D. Kim and T. Shin (2007). "Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-

- binding protein in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis." *Brain Res* **1162**: 113-120.
- Kim, S. and R. R. Voskuhl (1999). "Decreased IL-12 production underlies the decreased ability of male lymph node cells to induce experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **162**(9): 5561-5568.
- Kimura, A., T. Naka and T. Kishimoto (2007). "IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(29): 12099-12104.
- Kleinschek, M. A., A. M. Owyang, B. Joyce-Shaikh, C. L. Langrish, Y. Chen, D. M. Gorman, W. M. Blumenschein, T. McClanahan, F. Brombacher, S. D. Hurst, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2007). "IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation." *J Exp Med* **204**(1): 161-170.
- Koh, D. R., W. P. Fung-Leung, A. Ho, D. Gray, H. Acha-Orbea and T. W. Mak (1992). "Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice." *Science* **256**(5060): 1210-1213.
- Kohm, A. P., P. A. Carpentier, H. A. Anger and S. D. Miller (2002). "Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **169**(9): 4712-4716.
- Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo and Y. Iwakura (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **177**(1): 566-573.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." *Annu Rev Immunol* **27**: 485-517.
- Korner, H., D. S. Riminton, D. H. Strickland, F. A. Lemckert, J. D. Pollard and J. D. Sedgwick (1997). "Critical points of tumor necrosis factor action in central nervous system autoimmune inflammation defined by gene targeting." *J Exp Med* **186**(9): 1585-1590.
- Korporal, M., J. Haas, B. Balint, B. Fritzsche, A. Schwarz, S. Moeller, B. Fritz, E. Suri-Payer and B. Wildemann (2008). "Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells." *Arch Neurol* **65**(11): 1434-1439.
- Krakowski, M. and T. Owens (1996). "Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis." *Eur J Immunol* **26**(7): 1641-1646.
- Krammer, P. H., R. Arnold and I. N. Lavrik (2007). "Life and death in peripheral T cells." *Nat Rev Immunol* **7**(7): 532-542.
- Kreymborg, K., R. Etzensperger, L. Dumoutier, S. Haak, A. Rebollo, T. Buch, F. L. Heppner, J. C. Renauld and B. Becher (2007). "IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **179**(12): 8098-8104.
- Kuchroo, V. K., A. C. Anderson, H. Waldner, M. Munder, E. Bettelli and L. B. Nicholson (2002). "T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire." *Annu Rev Immunol* **20**: 101-123.
- Kuruvilla, A. P., R. Shah, G. M. Hochwald, H. D. Liggitt, M. A. Palladino and G. J. Thorbecke (1991). "Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(7): 2918-2921.

- Kwong, B. Y., S. J. Roberts, T. Silberzahn, R. B. Filler, J. H. Neustadter, A. Galan, S. Reddy, W. M. Lin, P. D. Ellis, C. F. Langford, A. C. Hayday and M. Girardi (2010). "Molecular analysis of tumor-promoting CD8⁺ T cells in two-stage cutaneous chemical carcinogenesis." J Invest Dermatol **130**(6): 1726-1736.
- La Mantia, L., L. M. Munari and R. Lovati (2010). "Glatiramer acetate for multiple sclerosis." Cochrane Database Syst Rev **5**: CD004678.
- Laan, M., Z. H. Cui, H. Hoshino, J. Lotvall, M. Sjostrand, D. C. Gruenert, B. E. Skoogh and A. Linden (1999). "Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways." J Immunol **162**(4): 2347-2352.
- Ladi, E., X. Yin, T. Chtanova and E. A. Robey (2006). "Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection." Nat Immunol **7**(4): 338-343.
- Lafaille, J. J. (1998). "The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases." Cytokine Growth Factor Rev **9**(2): 139-151.
- Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.
- Langrish, C. L., B. S. McKenzie, N. J. Wilson, R. de Waal Malefyt, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2004). "IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity." Immunol Rev **202**: 96-105.
- Leonard, J. P., K. E. Waldburger, R. G. Schaub, T. Smith, A. K. Hewson, M. L. Cuzner and S. J. Goldman (1997). "Regulation of the inflammatory response in animal models of multiple sclerosis by interleukin-12." Crit Rev Immunol **17**(5-6): 545-553.
- Leveque, L., F. Deknuydt, G. Bioley, L. J. Old, J. Matsuzaki, K. Odunsi, M. Ayyoub and D. Valmori (2009). "Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4⁺ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells." J Immunother **32**(2): 101-108.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, F. Galbiati, S. Squadrone, R. de Waal Malefyt and M. G. Roncarolo (2001). "IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells." J Immunol **166**(9): 5530-5539.
- Li, L., C. Yee and J. A. Beavo (1999). "CD3- and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation." Science **283**(5403): 848-851.
- Liang, L., E. Beshay and G. J. Prud'homme (1998). "The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram prevent diabetes in NOD mice." Diabetes **47**(4): 570-575.
- Likosky, W. H., B. Fireman, R. Elmore, G. Eno, K. Gale, G. B. Goode, K. Ikeda, J. Laster, C. Mosher, J. Rozance and et al. (1991). "Intense immunosuppression in chronic progressive multiple sclerosis: the Kaiser study." J Neurol Neurosurg Psychiatry **54**(12): 1055-1060.
- Lily, O., J. Palace and A. Vincent (2004). "Serum autoantibodies to cell surface determinants in multiple sclerosis: a flow cytometric study." Brain **127**(Pt 2): 269-279.
- Linden, A., M. Laan and G. P. Anderson (2005). "Neutrophils, interleukin-17A and lung disease." Eur Respir J **25**(1): 159-172.
- Lindholm, D., E. Castren, R. Kiefer, F. Zafra and H. Thoenen (1992). "Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation." J Cell Biol **117**(2): 395-400.

- Lindsey, J. W., S. Hodgkinson, R. Mehta, D. Mitchell, D. Enzmann and L. Steinman (1994). "Repeated treatment with chimeric anti-CD4 antibody in multiple sclerosis." Ann Neurol **36**(2): 183-189.
- Link, J., M. Soderstrom, T. Olsson, B. Hojeberg, A. Ljungdahl and H. Link (1994). "Increased transforming growth factor-beta, interleukin-4, and interferon-gamma in multiple sclerosis." Ann Neurol **36**(3): 379-386.
- Liu, J., M. W. Marino, G. Wong, D. Grail, A. Dunn, J. Bettadapura, A. J. Slavin, L. Old and C. C. Bernard (1998). "TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination." Nat Med **4**(1): 78-83.
- Logan, A., S. A. Frautschy, A. M. Gonzalez, M. B. Sporn and A. Baird (1992). "Enhanced expression of transforming growth factor beta 1 in the rat brain after a localized cerebral injury." Brain Res **587**(2): 216-225.
- Lombardi, G., P. J. Dunne, D. Scheel-Toellner, T. Sanyal, D. Pilling, L. S. Taams, P. Life, J. M. Lord, M. Salmon and A. N. Akbar (2000). "Type 1 IFN maintains the survival of anergic CD4+ T cells." J Immunol **165**(7): 3782-3789.
- Lorthiois, E., P. Bernardelli, F. Vergne, C. Oliveira, A. K. Mafroud, E. Proust, L. Heuze, F. Moreau, M. Idrissi, A. Tertre, B. Bertin, M. Coupe, R. Wrigglesworth, A. Descours, P. Soulard and P. Berna (2004). "Spiroquinazolinones as novel, potent, and selective PDE7 inhibitors. Part 1." Bioorg Med Chem Lett **14**(18): 4623-4626.
- Luca, M. E., L. Visser, C. J. Lucas and L. Nagelkerken (1999). "IFN-beta modulates specific T cell responses in vitro but does not affect Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the SJL mouse." J Neuroimmunol **100**(1-2): 190-196.
- Ma, R., B. Y. Yang and C. Y. Wu (2008). "A selective phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor Zl-n-91 suppresses IL-17 production by human memory Th17 cells." Int Immunopharmacol **8**(10): 1408-1417.
- Makwana, M., L. L. Jones, D. Cuthill, H. Heuer, M. Bohatschek, M. Hristova, S. Friedrichsen, I. Ormsby, D. Bueringer, A. Koppius, K. Bauer, T. Doetschman and G. Raivich (2007). "Endogenous transforming growth factor beta 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS." J Neurosci **27**(42): 11201-11213.
- Manning, C. D., M. Burman, S. B. Christensen, L. B. Cieslinski, D. M. Essayan, M. Grous, T. J. Torphy and M. S. Barnette (1999). "Suppression of human inflammatory cell function by subtype-selective PDE4 inhibitors correlates with inhibition of PDE4A and PDE4B." Br J Pharmacol **128**(7): 1393-1398.
- Martin-Saavedra, F. M., N. Flores, B. Dorado, C. Eguiluz, B. Bravo, A. Garcia-Merino and S. Ballester (2007). "Beta-interferon unbalances the peripheral T cell proinflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis." Mol Immunol **44**(14): 3597-3607.
- Martin-Saavedra, F. M., C. Gonzalez-Garcia, B. Bravo and S. Ballester (2008). "Beta interferon restricts the inflammatory potential of CD4+ cells through the boost of the Th2 phenotype, the inhibition of Th17 response and the prevalence of naturally occurring T regulatory cells." Mol Immunol **45**(15): 4008-4019.
- Martinez, A., A. Castro, C. Gil, M. Miralpeix, V. Segarra, T. Domenech, J. Beleta, J. M. Palacios, H. Ryder, X. Miro, C. Bonet, J. M. Casacuberta, F. Azorin, B. Pina and P. Puigdomenech (2000). "Benzyl derivatives of 2,1,3-benzo- and benzothieno[3,2-a]thiadiazine 2,2-dioxides: first phosphodiesterase 7 inhibitors." J Med Chem **43**(4): 683-689.
- Martinez, I., C. Puerta, C. Redondo and A. Garcia-Merino (1999). "Type IV phosphodiesterase inhibition in experimental allergic encephalomyelitis of

- Lewis rats: sequential gene expression analysis of cytokines, adhesion molecules and the inducible nitric oxide synthase." *J Neurol Sci* **164**(1): 13-23.
- Matusevicius, D., P. Kivisakk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci, S. Fredrikson and H. Link (1999). "Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis." *Mult Scler* **5**(2): 101-104.
- McFarland, H. F. and R. Martin (2007). "Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity." *Nat Immunol* **8**(9): 913-919.
- McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan and D. J. Cua (2007). "TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology." *Nat Immunol* **8**(12): 1390-1397.
- McGeachy, M. J., Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea and D. J. Cua (2009). "The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo." *Nat Immunol* **10**(3): 314-324.
- McGeachy, M. J., L. A. Stephens and S. M. Anderton (2005). "Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system." *J Immunol* **175**(5): 3025-3032.
- Menniti, F. S., W. S. Faraci and C. J. Schmidt (2006). "Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development." *Nat Rev Drug Discov* **5**(8): 660-670.
- Miller, A., S. Shapiro, R. Gershtein, A. Kinarty, H. Rawashdeh, S. Honigman and N. Lahat (1998). "Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation." *J Neuroimmunol* **92**(1-2): 113-121.
- Miller, M. D., S. Gould-Fogerite, L. Shen, R. M. Woods, S. Koenig, R. J. Mannino and N. L. Letvin (1992). "Vaccination of rhesus monkeys with synthetic peptide in a fusogenic proteoliposome elicits simian immunodeficiency virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **176**(6): 1739-1744.
- Moore, C. S., N. Earl, R. Frenette, A. Styhler, J. A. Mancini, D. W. Nicholson, A. L. Hebb, T. Owens and G. S. Robertson (2006). "Peripheral phosphodiesterase 4 inhibition produced by 4-[2-(3,4-Bis-difluoromethoxyphenyl)-2-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)-phenyl]-ethyl]-3-methylpyridine-1-oxide (L-826,141) prevents experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Pharmacol Exp Ther* **319**(1): 63-72.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* **19**: 683-765.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136**(7): 2348-2357.
- Murphy, C. A., C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick and D. J. Cua (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." *J Exp Med* **198**(12): 1951-1957.
- Nagelkerken, L., B. Blauw and M. Tielemans (1997). "IL-4 abrogates the inhibitory effect of IL-10 on the development of experimental allergic encephalomyelitis in SJL mice." *Int Immunol* **9**(9): 1243-1251.

- Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo and Y. Iwakura (2003). "Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice." J Immunol **171**(11): 6173-6177.
- Nakata, A., K. Ogawa, T. Sasaki, N. Koyama, K. Wada, J. Kotera, H. Kikkawa, K. Omori and O. Kaminuma (2002). "Potential role of phosphodiesterase 7 in human T cell function: comparative effects of two phosphodiesterase inhibitors." Clin Exp Immunol **128**(3): 460-466.
- Namdar, A., B. Nikbin, M. Ghabaee, A. Bayati and M. Izad (2010). "Effect of IFN-beta therapy on the frequency and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and Foxp3 gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS): a preliminary study." J Neuroimmunol **218**(1-2): 120-124.
- Navikas, V., D. Matuszevicius, M. Soderstrom, R. Pirskanen, S. Fredrikson and H. Link (1998). "The phosphodiesterase i.v. inhibitor rolipram in vitro reduces the numbers of MBP-reactive IFN-gamma and TNF-alpha mRNA expressing blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis." Clin Neuropharmacol **21**(4): 236-244.
- Nikbin, B., M. M. Bonab, F. Khosravi and F. Talebian (2007). "Role of B cells in pathogenesis of multiple sclerosis." Int Rev Neurobiol **79**: 13-42.
- Noronha, A., A. Toscas and M. A. Jensen (1993). "Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **46**(1-2): 145-153.
- Ohara, J. and W. E. Paul (1988). "Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 8221-8225.
- Okuda, Y., S. Sakoda, H. Fujimura and T. Yanagihara (1996). "Pentoxifylline delays the onset of experimental allergic encephalomyelitis in mice by modulating cytokine production in peripheral blood mononuclear cells." Immunopharmacology **35**(2): 141-148.
- Okuda, Y., S. Sakoda and T. Yanagihara (1998). "The pattern of cytokine gene expression in lymphoid organs and peripheral blood mononuclear cells of mice with experimental allergic encephalomyelitis." Journal of Neuroimmunology **87**(147-155).
- Olsson, T (1995). "Critical influences of the cytokine orchestration on the outcome of myelin antigen-specific T-cell autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis." Immunol. Rev. **144**: 245-268.
- Onishi, R. M. and S. L. Gaffen (2010). "Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease." Immunology **129**(3): 311-321.
- Otsuka, T., D. Villaret, T. Yokota, Y. Takebe, F. Lee, N. Arai and K. Arai (1987). "Structural analysis of the mouse chromosomal gene encoding interleukin 4 which expresses B cell, T cell and mast cell stimulating activities." Nucleic Acids Res **15**(1): 333-344.
- Ouyang, W., J. K. Kolls and Y. Zheng (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity **28**(4): 454-467.
- Paintlia, A. S., M. K. Paintlia, M. Khan, T. Vollmer, A. K. Singh and I. Singh (2005). "HMG-CoA reductase inhibitor augments survival and differentiation of oligodendrocyte progenitors in animal model of multiple sclerosis." FASEB J **19**(11): 1407-1421.
- Paintlia, A. S., M. K. Paintlia, A. K. Singh, R. Stanislaus, A. G. Gilg, E. Barbosa and I. Singh (2004). "Regulation of gene expression associated with acute experimental autoimmune encephalomyelitis by Lovastatin." J Neurosci Res **77**(1): 63-81.

- Paintlia, A. S., M. K. Paintlia, I. Singh and A. K. Singh (2008). "Combined medication of lovastatin with rolipram suppresses severity of experimental autoimmune encephalomyelitis." Exp Neurol **214**(2): 168-180.
- Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nat Immunol **8**(12): 1353-1362.
- Paolillo, A., A. J. Coles, P. D. Molyneux, M. Gawne-Cain, D. MacManus, G. J. Barker, D. A. Compston and D. H. Miller (1999). "Quantitative MRI in patients with secondary progressive MS treated with monoclonal antibody Campath 1H." Neurology **53**(4): 751-757.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.
- Peck, A. B. and F. H. Bach (1973). "A miniaturized mouse mixed leukocyte culture in serum-free and mouse serum supplemented media." J. Immunol. Methods **3**: 147-164.
- Peck, A. and E. D. Mellins (2009). "Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example." Immunology.
- Peter, D., S. L. Jin, M. Conti, A. Hatzelmann and C. Zitt (2007). "Differential expression and function of phosphodiesterase 4 (PDE4) subtypes in human primary CD4+ T cells: predominant role of PDE4D." J Immunol **178**(8): 4820-4831.
- Pette, M., D. F. Pette, P. A. Muraro, E. Farnon, R. Martin and H. F. McFarland (1997). "Interferon-beta interferes with the proliferation but not with the cytokine secretion of myelin basic protein-specific, T-helper type 1 lymphocytes." Neurology **49**(2): 385-392.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pilling, D., A. N. Akbar, J. Girdlestone, C. H. Orteu, N. J. Borthwick, N. Amft, D. Scheel-Toellner, C. D. Buckley and M. Salmon (1999). "Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis." Eur J Immunol **29**(3): 1041-1050.
- Portoles, P., J. Rojo, A. Golby, M. Bonneville, S. Gromkowski, L. Greenbaum, C. A. Janeway, Jr., D. B. Murphy and K. Bottomly (1989). "Monoclonal antibodies to murine CD3 epsilon define distinct epitopes, one of which may interact with CD4 during T cell activation." J Immunol **142**(12): 4169-4175.
- Prieto, J. M. and M. Lema (2003). "[Interferon beta in multiple sclerosis]." Rev Neurol **36**(10): 980-990.
- Probert, L., K. Akassoglou, M. Pasparakis, G. Kontogeorgos and G. Kollias (1995). "Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11294-11298.
- Putheti, P., A. Pettersson, M. Soderstrom, H. Link and Y. M. Huang (2004). "Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs." J Clin Immunol **24**(2): 155-161.
- Racke, M. K., S. Dhib-Jalbut, B. Cannella, P. S. Albert, C. S. Raine and D. E. McFarlin (1991). "Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta 1." J Immunol **146**(9): 3012-3017.

- Ren, Y. R., F. Pan, S. Parvez, A. Fleig, C. R. Chong, J. Xu, Y. Dang, J. Zhang, H. Jiang, R. Penner and J. O. Liu (2008). "Clofazimine inhibits human Kv1.3 potassium channel by perturbing calcium oscillation in T lymphocytes." *PLoS One* **3**(12): e4009.
- Renno, T., J. Y. Lin, C. Piccirillo, J. Antel and T. Owens (1994). "Cytokine production by cells in cerebrospinal fluid during experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice." *J Neuroimmunol* **49**(1-2): 1-7.
- Reyes-Irisarri, E., S. Perez-Torres and G. Mengod (2005). "Neuronal expression of cAMP-specific phosphodiesterase 7B mRNA in the rat brain." *Neuroscience* **132**(4): 1173-1185.
- Ridge, S. C., A. E. Sloboda, R. A. McReynolds, S. Levine, A. L. Oronsky and S. S. Kerwar (1985). "Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone." *Clin Immunol Immunopathol* **35**(1): 35-42.
- Rieckmann, P., M. Albrecht, B. Kitze, T. Weber, H. Tumani, A. Broocks, W. Luer and S. Poser (1994). "Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis." *Neurology* **44**(8): 1523-1526.
- Rio, J., C. Nos, M. Tintore, N. Tellez, I. Galan, R. Pelayo, M. Comabella and X. Montalban (2006). "Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients." *Ann Neurol* **59**(2): 344-352.
- Rivers, T.M., D.H. Sprunt and G.P. Berry (1933). "Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys." *J Exp Med* **58**: 39-53.
- Rohn, T. A., G. T. Jennings, M. Hernandez, P. Grest, M. Beck, Y. Zou, M. Kopf and M. F. Bachmann (2006). "Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis." *Eur J Immunol* **36**(11): 2857-2867.
- Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula and M. K. Levings (2001). "Type 1 T regulatory cells." *Immunol Rev* **182**: 68-79.
- Rott, O., E. Cash and B. Fleischer (1993). "Phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline, a selective suppressor of T helper type 1- but not type 2-associated lymphokine production, prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats." *Eur J Immunol* **23**(8): 1745-1751.
- Rott, O., B. Fleischer and E. Cash (1994). "Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats." *Eur J Immunol* **24**(6): 1434-1440.
- Rowbottom, A. W., M. A. Lepper, R. J. Garland, C. V. Cox and E. G. Corley (1999). "Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation." *Immunology* **98**(1): 80-89.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* **22**: 531-562.
- Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi and T. Nomura (2006). "Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease." *Immunol Rev* **212**: 8-27.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-1164.
- Sanchez-Guajardo, V., C. Tanchot, J. T. O'Malley, M. H. Kaplan, S. Garcia and A. A. Freitas (2007). "Agonist-driven development of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells requires a second signal mediated by Stat6." *J Immunol* **178**(12): 7550-7556.

- Sanchez, A. J., C. Puerta, S. Ballester, P. Gonzalez, A. Arriaga and A. Garcia-Merino (2005). "Rolipram impairs NF-kappaB activity and MMP-9 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **168**(1-2): 13-20.
- Schandene, L., C. Alonso-Vega, F. Willems, C. Gerard, A. Delvaux, T. Velu, R. Devos, M. de Boer and M. Goldman (1994). "B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10." J Immunol **152**(9): 4368-4374.
- Scheel-Toellner, D., D. Pilling, A. N. Akbar, D. Hardie, G. Lombardi, M. Salmon and J. M. Lord (1999). "Inhibition of T cell apoptosis by IFN-beta rapidly reverses nuclear translocation of protein kinase C-delta." Eur J Immunol **29**(8): 2603-2612.
- Segal, B. M., B. K. Dwyer and E. M. Shevach (1998). "An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease." J Exp Med **187**(4): 537-546.
- Sena, A., R. Pedrosa and M. Graca Morais (2003). "Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis." J Neurol **250**(6): 754-755.
- Sharief, M. K. and R. Hentges (1991). "Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis." N Engl J Med **325**(7): 467-472.
- Shaywitz, A. J. and M. E. Greenberg (1999). "CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals." Annu Rev Biochem **68**: 821-861.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." Nat Rev Immunol **2**(6): 389-400.
- Shimoda, K., J. van Deursen, M. Y. Sangster, S. R. Sarawar, R. T. Carson, R. A. Tripp, C. Chu, F. W. Quelle, T. Nosaka, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. Grosveld, W. E. Paul and J. N. Ihle (1996). "Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene." Nature **380**(6575): 630-633.
- Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky and M. S. Jordan (2009). "T cell activation." Annu Rev Immunol **27**: 591-619.
- Smith, S. J., L. B. Cieslinski, R. Newton, L. E. Donnelly, P. S. Fenwick, A. G. Nicholson, P. J. Barnes, M. S. Barnette and M. A. Giembycz (2004). "Discovery of BRL 50481 [3-(N,N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes." Mol Pharmacol **66**(6): 1679-1689.
- Son, Y., T. Ito, Y. Ozaki, T. Tanijiri, T. Yokoi, K. Nakamura, M. Takebayashi, R. Amakawa and S. Fukuhara (2006). "Prostaglandin E2 is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells." Immunology **119**(1): 36-42.
- Sospedra, M. and R. Martin (2005). "Immunology of multiple sclerosis." Annu Rev Immunol **23**: 683-747.
- Spitalny, G. L. and E. A. Havell (1984). "Monoclonal antibody to murine gamma interferon inhibits lymphokine-induced antiviral and macrophage tumoricidal activities." J Exp Med **159**(5): 1560-1565.
- Stanislaus, R., A. K. Singh and I. Singh (2001). "Lovastatin treatment decreases mononuclear cell infiltration into the CNS of Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis." J Neurosci Res **66**(2): 155-162.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman and R. D. Schreiber (1998). "How cells respond to interferons." Annu Rev Biochem **67**: 227-264.

- Steinman, L. (1999). "Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy." *Neuron* **24**(3): 511-514.
- Steinman, L. (2007). "A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage." *Nat Med* **13**(2): 139-145.
- Stephens, L. A., K. H. Malpass and S. M. Anderton (2009). "Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3⁺ Treg." *Eur J Immunol* **39**(4): 1108-1117.
- Stover, J. F., K. Lowitzsch and O. S. Kempinski (1997). "Cerebrospinal fluid hypoxanthine, xanthine and uric acid levels may reflect glutamate-mediated excitotoxicity in different neurological diseases." *Neurosci Lett* **238**(1-2): 25-28.
- Stover, J. F., U. E. Pleines, M. C. Morganti-Kossmann, T. Kossmann, K. Lowitzsch and O. S. Kempinski (1997). "Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity." *Eur J Clin Invest* **27**(12): 1038-1043.
- Stritesky, G. L., N. Yeh and M. H. Kaplan (2008). "IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage." *J Immunol* **181**(9): 5948-5955.
- Stromnes, I. M., L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris and J. M. Goverman (2008). "Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells." *Nat Med* **14**(3): 337-342.
- Stumhofer, J. S., J. Silver and C. A. Hunter (2007). "Negative regulation of Th17 responses." *Semin Immunol* **19**(6): 394-399.
- Sun, D., J. N. Whitaker, Z. Huang, D. Liu, C. Coleclough, H. Wekerle and C. S. Raine (2001). "Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice." *J Immunol* **166**(12): 7579-7587.
- Suzumura, A., M. Sawada, Y. Itoh and T. Marunouchi (1994). "Interleukin-4 induces proliferation and activation of microglia but suppresses their induction of class II major histocompatibility complex antigen expression." *J Neuroimmunol* **53**(2): 209-218.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman and L. H. Glimcher (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." *Cell* **100**(6): 655-669.
- Taams, L. S., J. Smith, M. H. Rustin, M. Salmon, L. W. Poulter and A. N. Akbar (2001). "Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population." *Eur J Immunol* **31**(4): 1122-1131.
- Taga, K., B. Cherney and G. Tosato (1993). "IL-10 inhibits apoptotic cell death in human T cells starved of IL-2." *Int Immunol* **5**(12): 1599-1608.
- Takeda, K., T. Tanaka, W. Shi, M. Matsumoto, M. Minami, S. Kashiwamura, K. Nakanishi, N. Yoshida, T. Kishimoto and S. Akira (1996). "Essential role of Stat6 in IL-4 signalling." *Nature* **380**(6575): 627-630.
- Taki, S. (2002). "Type I interferons and autoimmunity: lessons from the clinic and from IRF-2-deficient mice." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(4-5): 379-391.
- Teige, I., A. Treschow, A. Teige, R. Mattsson, V. Navikas, T. Leanderson, R. Holmdahl and S. Issazadeh-Navikas (2003). "IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **170**(9): 4776-4784.
- Teunissen, M. B., C. W. Koomen, R. de Waal Malefyt, E. A. Wierenga and J. D. Bos (1998). "Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **111**(4): 645-649.

- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* **188**(2): 287-296.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." *J Immunol* **164**(1): 183-190.
- Tokunaga, K., H. Taniguchi, K. Yoda, M. Shimizu and S. Sakiyama (1986). "Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal beta-actin mRNA." *Nucleic Acids Res* **14**(6): 2829.
- Torgersen, K. M., T. Vang, H. Abrahamsen, S. Yaqub and K. Tasken (2002). "Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function." *Cell Signal* **14**(1): 1-9.
- Tran, E. H., E. N. Prince and T. Owens (2000). "IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines." *J Immunol* **164**(5): 2759-2768.
- Traugott, U., E. L. Reinherz and C. S. Raine (1983). "Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages." *J Neuroimmunol* **4**(3): 201-221.
- Tuohy, V. K., M. Yu, L. Yin, P. M. Mathisen, J. M. Johnson and J. A. Kawczak (2000). "Modulation of the IL-10/IL-12 cytokine circuit by interferon-beta inhibits the development of epitope spreading and disease progression in murine autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **111**(1-2): 55-63.
- Tzartos, J. S., M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri and L. Fugger (2008). "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." *Am J Pathol* **172**(1): 146-155.
- Unsicker, K., K. C. Flanders, D. S. Cissel, R. Lafyatis and M. B. Sporn (1991). "Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system." *Neuroscience* **44**(3): 613-625.
- van Oosten, B. W., M. Lai, S. Hodgkinson, F. Barkhof, D. H. Miller, I. F. Moseley, A. J. Thompson, P. Rudge, A. McDougall, J. G. McLeod, H. J. Ader and C. H. Polman (1997). "Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial." *Neurology* **49**(2): 351-357.
- Vandenbroeck, K., A. Goris, R. Murru, A. Billiau, G. Opdenakker and M. G. Marrosu (1999). "A dinucleotide repeat polymorphism located in the IFN-alpha/beta gene cluster at chromosome 9p22 is not associated with multiple sclerosis in Sardinia." *Exp Clin Immunogenet* **16**(1): 26-29.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, R. A. Flavell and B. Stockinger (2006). "Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease." *Nat Immunol* **7**(11): 1151-1156.
- Vergne, F., P. Bernardelli, E. Lorthiois, N. Pham, E. Proust, C. Oliveira, A. K. Mafrout, P. Ducrot, R. Wrigglesworth, F. Berlioz-Seux, F. Coleon, E. Chevalier, F. Moreau, M. Idrissi, A. Tertre, A. Descours, P. Berna and M. Li (2004). "Discovery of thiadiazoles as a novel structural class of potent and selective PDE7 inhibitors. Part 2: metabolism-directed optimization studies towards orally bioavailable derivatives." *Bioorg Med Chem Lett* **14**(18): 4615-4621.

- Vig, M., A. George, R. Sen, J. Durdik, S. Rath and V. Bal (2002). "Commitment of activated T cells to secondary responsiveness is enhanced by signals mediated by cAMP-dependent protein kinase A-I." *Mol Pharmacol* **62**(6): 1471-1481.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H. L. Weiner and D. A. Hafler (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." *J Exp Med* **199**(7): 971-979.
- Vijayakrishnan, L., S. Rudra, M. S. Eapen, S. Dastidar and A. Ray (2007). "Small-molecule inhibitors of PDE-IV and -VII in the treatment of respiratory diseases and chronic inflammation." *Expert Opin Investig Drugs* **16**(10): 1585-1599.
- Vollmer, T., L. Key, V. Durkalski, W. Tyor, J. Corboy, S. Markovic-Plese, J. Preiningerova, M. Rizzo and I. Singh (2004). "Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis." *Lancet* **363**(9421): 1607-1608.
- Wang, Y., J. T. Evans, F. Rodriguez, P. Fields, C. Mueller, T. Chitnis, S. J. Khoury and M. S. Bynoe (2009). "A tale of two STAT6 knock out mice in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **206**(1-2): 76-85.
- Werner, P., D. Pitt and C. S. Raine (2001). "Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage." *Ann Neurol* **50**(2): 169-180.
- Willenborg, D. O., S. Fordham, C. C. Bernard, W. B. Cowden and I. A. Ramshaw (1996). "IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **157**(8): 3223-3227.
- Williams, A., G. Piaton and C. Lubetzki (2007). "Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis?" *Glia* **55**(13): 1300-1312.
- Williams, R. O. (2002). "Cutting edge: A-kinase anchor proteins are involved in maintaining resting T cells in an inactive state." *J Immunol* **168**(11): 5392-5396.
- Wing, K., S. Lindgren, G. Kollberg, A. Lundgren, R. A. Harris, A. Rudin, S. Lundin and E. Suri-Payer (2003). "CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells." *Eur J Immunol* **33**(3): 579-587.
- Wyss-Coray, T., P. Borrow, M. J. Brooker and L. Mucke (1997). "Astroglial overproduction of TGF-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice." *J Neuroimmunol* **77**(1): 45-50.
- Yadav, M., J. Rosenbaum and E. J. Goetzl (2008). "Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile." *J Immunol* **180**(5): 2772-2776.
- Yamamoto, S., S. Sugahara, R. Naito, A. Ichikawa, K. Ikeda, T. Yamada and Y. Shimizu (2006). "The effects of a novel phosphodiesterase 7A and -4 dual inhibitor, YM-393059, on T-cell-related cytokine production in vitro and in vivo." *Eur J Pharmacol* **541**(1-2): 106-114.
- Yang, G., K. W. McIntyre, R. M. Townsend, H. H. Shen, W. J. Pitts, J. H. Dodd, S. G. Nadler, M. McKinnon and A. J. Watson (2003). "Phosphodiesterase 7A-deficient mice have functional T cells." *J Immunol* **171**(12): 6414-6420.
- Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten and C. Dong (2008). "T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma." *Immunity* **28**(1): 29-39.

- Yasuda, C. L., A. Al-Sabbagh, E. C. Oliveira, B. M. Diaz-Bardales, A. A. Garcia and L. M. Santos (1999). "Interferon beta modulates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the pattern of cytokine secretion." Immunol Invest **28**(2-3): 115-126.
- Yednock, T. A., C. Cannon, L. C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman and N. Karin (1992). "Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin." Nature **356**(6364): 63-66.
- Youssef, S., O. Stuve, J. C. Patarroyo, P. J. Ruiz, J. L. Radosevich, E. M. Hur, M. Bravo, D. J. Mitchell, R. A. Sobel, L. Steinman and S. S. Zamvil (2002). "The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease." Nature **420**(6911): 78-84.
- Zhang, B., M. D. Walsh, K. B. Nguyen, N. C. Hillyard, A. C. Cavanagh, P. A. McCombe and H. Morton (2003). "Early pregnancy factor treatment suppresses the inflammatory response and adhesion molecule expression in the spinal cord of SJL/J mice with experimental autoimmune encephalomyelitis and the delayed-type hypersensitivity reaction to trinitrochlorobenzene in normal BALB/c mice." J Neurol Sci **212**(1-2): 37-46.
- Zhang, F., G. Meng and W. Strober (2008). "Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells." Nat Immunol **9**(11): 1297-1306.
- Zhang, X., D. N. Koldzic, L. Izikson, J. Reddy, R. F. Nazareno, S. Sakaguchi, V. K. Kuchroo and H. L. Weiner (2004). "IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells." Int Immunol **16**(2): 249-256.
- Zhao, M. L. and R. B. Fritz (1998). "Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-4- and alpha/beta T cell-deficient C57BL/6 mice." J Neuroimmunol **87**(1-2): 171-178.
- Zheng, S. G., J. D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa and D. A. Horwitz (2002). "Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors." J Immunol **169**(8): 4183-4189.
- Zheng, W. and R. A. Flavell (1997). "The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells." Cell **89**(4): 587-596.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2010). "Heterogeneity and plasticity of T helper cells." Cell Res **20**(1): 4-12.
- Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.

ARTÍCULOS

